

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAGDA FERNANDA PAIXÃO

EFEITOS DE FORMULAÇÕES E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*
(BERLINER, 1915) SOBRE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE) EM MAÇÃ

CURITIBA

2012

MAGDA FERNANDA PAIXÃO

EFEITOS DE FORMULAÇÕES E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*
(BERLINER, 1915) SOBRE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE) EM MAÇÃ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Agronomia, Área de concentração
Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e
Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná, como requisito à
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Lino Bittencourt Monteiro
Co-orientador: Ph. D. Rui Pereira Leite Júnior

CURITIBA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL





PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **MAGDA FERNANDA PAIXÃO**, sob o título "**EFEITOS DE FORMULAÇÕES E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915) SOBRE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EM MAÇÃ**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.


Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 1º de Março de 2012.


Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa


Professor Dr. Josue Sant'Ana
Primeiro Examinador


Dra. Suzete Penteado
Segunda Examinadora


Professor Dr. Luis Amilton Foerster
Terceiro Examinador


Professor Dr. Lind Bittencourt Monteiro
Presidente da Banca e Orientador

Dedico e Agradeço

À Deus, minha fonte de inspiração e sabedoria.

À minha mãe Leonor por me presentear com o dom da vida.

Aos meus pais, José e Sônia, pelo imenso amor e educação para a vida.

Ao meu marido, José Lino, pelo amor, atenção, confiança e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para concretização de mais uma etapa da minha vida, à minha imensa gratidão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lino Bittencourt Monteiro, por sua dedicação na minha orientação, por me proporcionar uma visão mais crítica, pela sua confiança e ensinamentos que contribuirão para o meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador Dr. Rui Pereira Leite Júnior pela valiosa contribuição no trabalho, paciência, confiança e acolhimento em seu laboratório.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal da UFPR pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná por disponibilizar a estrutura necessária para a condução de alguns experimentos.

Ao Dr. Laurival Antonio Villas-Bôas (UEL) e suas orientadas Ana e Lilian pelo auxílio nas metodologias de isolamento e identificação de *Bt*.

Ao pesquisador Dr. Edilson Batista de Oliveira (Embrapa Florestas) e o prof. Dr. Henrique Koehler (UFPR) pelas orientações nas análises estatísticas.

Ao Dr. Roberto Hauagge por disponibilizar algumas mudas de macieira “Eva” para os estudos em casa de vegetação.

À José Lino Martinez pelo fornecimento de frutos para estudos de laboratório, por ceder área de pomar para estudos de campo, por auxiliar na condução das macieira cultivadas em casa de vegetação e aos seus funcionários Adão e João por sempre estarem dispostos a auxiliar durante a condução dos experimentos.

À empresa Pomalapa pela área de pomar cedida para fins de estudos de campo e aos funcionários Neraldo e Evaldo pelo auxílio e atenção durante a condução dos experimentos.

À empresa Boutin pelo fornecimento de frutos e a Frutalapa por ceder câmara fria para armazenamento dos frutos utilizados nos estudos de laboratório.

Aos examinadores da banca de pré-defesa e defesa, Dr. Marcílio José Thomazini, Prof. Dra. Cristina G. Mendonça e Dra. Myriam Coracini, Prof. Dr. Josué Sant’Ana, Dra. Suzete Penteado e Prof. Dr. Luís Amilton Foerster pelas valiosas contribuições para o aprimoramento do meu trabalho.

Aos professores: Álvaro F. dos Santos, Cícero Deschamps, Flavio Zanette, Francine L. Cuquel, Henrique Koehler, Kátia Zuffellato, Larissa May de Mio, Luis Antonio Biasi, Raquel Negrelle, Ricardo Oliveira e Sonia Lazzari pelos conhecimentos compartilhados.

À Lucimara, secretária do programa pgapv, pela atenção, carinho e por sempre auxiliar no que fosse necessário.

Aos Lamipeanos: Aline, André, Bruno, Bruno Pereira, Carol, Cadu, Débora, Ernani, Estefano (*in memoriam*), Fábio, Fred, Gabriel, Gustavo, Henrique, Jonathan, Jordana, Jussie, Marcel, Mariana, Mariele, Norliza, Pedro, Priscila, Rafael, Rebeca, Rosângela, Simone, Sr. Machado, Suzane, Tânia e Thaís pela colaboração na criação dos insetos e na condução dos trabalhos, pela amizade e pelos momentos divertidos que passamos juntos.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia do IAPAR: Andrei, Amanda, Felipe, Israel, Maria de Fátima, Mayara, Matias, Nádia, Vanessa pelo acolhimento, atenção, carinho e colaboração na condução dos trabalhos.

Aos amigos do mestrado: Ana Cláudia, Ana Selenia, Aparecida, Eduardo, Fernanda, Francelize, Francine, Gabriel, Giselda, Guilherme, Hágata, José Cavassim, Juliana, Luciane, Marcelle, Marcos, Mariana Grassi, Renato, Natasha pela amizade e momentos alegres compartilhados.

Ao amigo Baiano por ser um exemplo de honestidade, dedicação, carisma e força de vontade.

Ao meu mestre e amigo Dr. Nilceu R.X. Nazareno, pela sua valiosa amizade, paciência, confiança e ensinamentos que levarei por toda a minha vida.

Ao Dr. Dirk Cláudio Ahrens (IAPAR) e ao Dr. Denilton Vidolin (Faculdades Integradas Espírita) por concederem carta de recomendação para meu ingresso na pós-graduação.

À querida tia Marlene, uma das pessoas responsáveis por eu ter chegado até aqui, pelo seu carinho, apoio e valiosos conselhos.

Às queridas tias Barta, Bete e Solange pelo carinho, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Aguinaldo, Cleverson, Cristiano e Sarah pelo carinho, amizade, cumplicidade e momentos de alegria.

Ao meu sogro, José Martinez pelas suas orações para o meu ingresso no mestrado e à minha cunhada Conceição, pelo carinho e acolhimento durante participação de congresso.

Às minhas amigas Andréia, Andresa, Carol, Claudiana, Cléia, Crystianne, Madalena, Renatinha pela amizade sincera e apoio em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria gram-positiva, pertencente à família Bacillaceae. Possui a característica de produzir esporos e formar cristal protéico com atividade tóxica para lepidópteros. Sua ação ocorre na ingestão de tecidos contaminados da planta, por isso, a eficiência de produtos a base de *Bt* está relacionada com a quantidade de tecido contaminado ingerida. Larvas que possuem o hábito desfolhador se alimentam de grande quantidade de massa foliar, enquanto que larvas broqueadoras penetram em órgãos da planta para se alimentar do seu interior. Será que larvas broqueadoras ingerem quantidade de *Bt* suficiente para que ocorra a contaminação e morte? A presente dissertação tem o objetivo de testar a eficiência de três formulações comerciais de *Bt* no controle da larva broqueadora, *Grapholita molesta* em maçã sob condições de laboratório, casa de vegetação e campo. As formulações comerciais utilizadas foram Dipel[®], Xentari[®] e Agree[®], testadas na dose de campo (100g i.a. /100 L⁻¹). Maçãs cv “Eva” foram tratadas com os bioinseticidas e posteriormente infestadas com larvas neonatas de *G. molesta*. A dissertação foi dividida em três capítulos. No capítulo 1 foi estudado o efeito das formulações Dipel[®], Xentari[®] e Agree[®] sobre larvas de *G. molesta* em maçã sob condições de laboratório, casa de vegetação e campo. No capítulo 2 realizou-se a comparação de metodologias de aplicação de Dipel[®] em maçã para *G. molesta* em laboratório. No capítulo 3 verificou-se a persistência de toxicidade de *B. thuringiensis* em maçã para *G. molesta* sob condições de laboratório e casa de vegetação. No capítulo 1 foi observado que as formulações comerciais Agree[®], Dipel[®] e Xentari[®] apresentaram baixa mortalidade em laboratório, casa de vegetação e pomar. No capítulo 2 foi verificado que não houve diferença na mortalidade de *G. molesta* entre os métodos de aplicação testados. A maior porcentagem de penetração de larvas de *G. molesta* foi verificada através do cálice da maçã. No capítulo 3 foi observado que não houve diferença entre os períodos de infestação nas três formulações comerciais de *Bt* em frutos infestados em laboratório e casa de vegetação. A eficiência de controle foi insatisfatória, devido o comportamento alimentar e a preferência de penetração de larvas de *Grapholita molesta*. Com base nos dados obtidos conclui-se que nas condições experimentais estudadas, as formulações Agree[®], Dipel[®] e Xentari[®] apresentaram eficiência insatisfatória para a mortalidade de larvas de *G. molesta*.

Palavras - chave: controle biológico, entomopatógeno, mariposa oriental.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (*Bt*) is a gram-positive bacterium, from Bacillaceae the family. It produces spores and crystal protein with toxic activity against Lepidoptera larval. Its action occurs by the intake of plants tissues *Bt* infected. The efficiency of *Bt* based products is *Bt* related to the amount of contaminated tissue ingested by larval. Defoliator larvae feeds great mass at leaves, while borer larvae penetrates plant tissues to feed inside. So, does borer larvae eats enough *Bt* infected plant tissue causing contamination and death? The present work aimed to test the efficiency of three *Bt* commercial formulations to control *Grapholita molesta* larvae in apple under laboratory conditions, greenhouse and orchard. Commercial formulations used were Dipel[®], Xentari[®] and Agree[®], at the dose tested 100 g a.i. / 100 L⁻¹. Apples cv "Eva" were treated with biopesticides and subsequently infested with neonate larvae of *G. molesta*. The dissertation was divided into three chapters. In chapter 1 was a study on the effect of Dipel[®], Xentari[®] and Agree[®] formulations on *G. molesta* larvae in apples under laboratory, greenhouse and orchard conditions. On chapter 2 was performed a test comparing application methodologies for Dipel[®] in apple to control *G. molesta* a test in the laboratory. In chapter 3 it was conducted a study of *B. thuringiensis* persistent toxicity in apple against *G. molesta* under laboratory and greenhouse conductions. In chapter 1 it was observed that commercial formulations Agree[®], Dipel[®] and Xentari[®] showed low larvae mortality at laboratory, greenhouse and orchard. On chapter 2 was found that no difference in mortality *G. molesta* among application methods tested. The highest priority penetration site of *G. molesta* larvae was verified at the apple calyx. In chapter 3 it was observed that there was no difference comparing infestation periods for the commercial formulations of *Bt* tested under laboratory and greenhouse conditions. The control efficiency was unsatisfactory due to eating behavior and preference penetration of *G. molesta* larvae. Based on the results obtained it was concluded that under experimental conditions, Agree[®], Dipel[®] and Xentari[®] formulations, were unsatisfactory for the control *G. molesta* larvae.

Key - words: biological control, entomopathogenic, oriental moth fruit.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1. CAPÍTULO I - EFEITO DE TRÊS FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> (BERLINER, 1915) SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE <i>Grapholita molesta</i> (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EM MAÇÃ	19
1.1 INTRODUÇÃO.....	21
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1.2.1 Tratamentos.....	22
1.2.2 Criação de <i>Grapholita molesta</i>	22
1.2.3 Experimento em laboratório.....	22
1.2.4 Experimento em casa de vegetação.....	23
1.2.5 Experimentos em pomares de macieira.....	23
1.2.5.1 Imersão de frutos em soluções de <i>Bt</i>	23
1.2.5.2 Pulverização de frutos com soluções de <i>Bt</i>	24
1.2.6 Parâmetros avaliados.....	25
1.2.7 Análise estatística.....	25
1.3 RESULTADOS.....	25
1.3.1 Experimento em laboratório.....	25
1.3.2 Experimento em casa de vegetação.....	26
1.3.3 Experimentos em pomares de macieira.....	27
1.3.3.1 Imersão de frutos em soluções de <i>Bt</i>	27
1.3.3.2 Pulverização de frutos com soluções de <i>Bt</i>	28
1.4 DISCUSSÃO.....	29
1.5 CONCLUSÕES.....	31
1.6 REFERÊNCIAS.....	31
2. CAPÍTULO II - ANÁLISE DE METODOLOGIAS DE APLICAÇÃO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EM MAÇÃ NA MORTALIDADE DE LARVAS DE <i>Grapholita Molesta</i> (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EM LABORATÓRIO.....	34
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.2.1 Criação de insetos.....	37

2.2.2	Influência da adição de surfactantes.....	37
2.2.3	Influência dos métodos de aplicação de <i>Bt</i>	38
2.2.4	Teste de coloração dos frutos.....	38
2.2.5	Concentração de células viáveis de <i>Bt kurstaki</i> em maçã.....	39
2.2.6	Análise estatística.....	39
2.3	RESULTADOS.....	40
2.3.1	Influência da adição de surfactantes.....	40
2.3.2	Influência dos métodos de aplicação de <i>Bt</i>	41
2.3.3	Teste de coloração dos frutos.....	42
2.3.4	Concentração de células viáveis de <i>Bt kurstaki</i> em maçã.....	42
2.4	DISCUSSÃO.....	43
2.5	CONCLUSÕES.....	45
2.6	REFERÊNCIAS.....	45
3.	CAPITULO III - ANÁLISE DO EFEITO RESIDUAL DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EM MAÇÃ NA MORTALIDADE DE LARVAS DE <i>Grapholita molesta</i> (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO.....	48
3.1	INTRODUÇÃO.....	50
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.2.1	Criação de <i>Grapholita molesta</i>	51
3.2.2	Efeito residual de <i>Bt</i> em laboratório.....	51
3.2.3	Efeito residual de <i>Bt</i> em casa de vegetação.....	52
3.2.4	Efeito residual de <i>Bt kurstaki</i> através de contagens de células viáveis.....	53
3.2.5	Análise estatística.....	53
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.3.1	Efeito residual de <i>Bt</i> em laboratório.....	54
3.3.2	Efeito residual de <i>Bt</i> em casa de vegetação.....	55
3.3.3	Efeito residual de <i>Bt kurstaki</i> através de contagens de células viáveis.....	55
3.4	CONCLUSÕES.....	59
3.5	REFERÊNCIAS.....	59
	CONCLUSÕES GERAIS.....	62
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de proteínas Cry (CRICKMORE <i>et al.</i> , 1998) e separação em 17 grupos (PEFEROEN, 1997).....	16
Tabela 1.1 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) de larvas de <i>G. molesta</i> infestada, em diferentes períodos, sobre frutos tratados com formulações comerciais de <i>B. thuringiensis</i> em condições de laboratório.....	26
Tabela 1.2 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de <i>G. molesta</i> infestada sobre frutos tratados com as formulações comerciais de <i>B. thuringiensis</i> em condições de casa de vegetação.....	27
Tabela 1.3 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de <i>G. molesta</i> infestada sobre frutos imersos nas formulações comerciais de <i>B. thuringiensis</i> em condições de campo. Lapa - PR, 2010.....	27
Tabela 1.4 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de <i>G. molesta</i> infestada em maçãs pulverizadas com as formulações comerciais de <i>B. thuringiensis</i> em condições de campo. Lapa – PR, 2011.....	28
Tabela 2.1 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de <i>G. molesta</i> em maçãs imersas em Dipel® com e sem adição de surfactante.....	40
Tabela 2.2 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) de larvas de <i>G. molesta</i> que penetraram no cálice, pedúnculo e superfície mediana de maçãs imersas em Dipel® e água destilada.....	41

Tabela 2.3 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de <i>G. molesta</i> em maçãs tratadas com Dipel® com diferentes métodos de aplicação.....	41
Tabela 2.4 - Percentagem média de maçãs (\pm EP) que apresentaram diferentes níveis de corante no cálice e pedúnculo após três métodos de aplicação.....	42
Tabela 3.1 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) de duas populações de larvas de <i>G. molesta</i> infestada, em diferentes períodos, em maçãs imersas em três formulações comerciais de <i>B. thuringiensis</i> , em laboratório.....	57
Tabela 3.2 - Percentagem média (\pm EP) de larvas de <i>G. molesta</i> que penetraram em três locais distintos da maçã (cálice, pedúnculo e superfície mediana) em frutos tratados com as formulações comerciais à base de <i>B. thuringiensis</i> em laboratório.....	57
Tabela 3.3 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de <i>G. molesta</i> infestada, em diferentes períodos, sobre frutos imersos em Dipel®, em casa de vegetação.....	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Percentagem de larvas de *G. molesta* que penetraram nas regiões do cálice; pedúnculo e superfície mediana de maçãs tratadas com formulações comerciais de *B. thuringiensis* em experimentos realizados em laboratório, casa de vegetação e pomar (imersão e pulverização de frutos), analisados pelo teste LSD ($P \leq 0,05$).....29
- Figura 2.1 - Concentração (média \pm EP) de *B. thuringiensis kurstaki* – (Dipel[®]) no cálice, pedúnculo e superfície mediana da maçã analisadas através do teste LSD ($P \leq 0,05$).....43
- Figura 3.1 - Efeito residual de células viáveis de *Bt kurstaki* (Dipel[®]) (média de $\log_{10} \pm$ EP) em maçãs tratadas com Dipel[®], isoladas em quatro diferentes períodos após a aplicação. Dados analisados através de Anova e comparação de médias pelo teste LSD ($P \leq 0,05$).....58

INTRODUÇÃO GERAL

A macieira *Malus domestica* Borkhausen é uma das principais frutíferas de clima temperado cultivadas no Brasil. Os estados da região sul são responsáveis pela maior parte da produção de maçãs no país, onde na safra de 2009/10 produziram 1.274,069 toneladas da fruta (IBGE, 2011). A mariposa-oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) é uma das principais pragas desta cultura, responsável por grandes prejuízos nas safras. Na sua fase larval possui comportamento alimentar broqueador, penetrando em frutos e ramos novos para se desenvolver e se alimentar do seu interior (SOUZA *et al.*, 2000). Nos frutos, o orifício de entrada é comumente observado nas regiões do cálice e pedúnculo, formando galerias no seu interior (SALLES, 1991; MYERS *et al.*, 2006).

O manejo de controle geralmente utilizado é o químico, com aplicação de inseticidas que possuem algumas restrições, tais como: intervalo de segurança, alta toxicidade, riscos de intoxicação, impacto negativo em organismos não-alvo e contaminação ambiental (ROHR e CRUMRINE, 2005). Entretanto, uma alternativa de controle que minimiza os problemas de impacto ambiental é o uso de controle biológico por meio de entomopatógenos.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) (Berliner, 1915) é uma bactéria que produz inclusões cristalinas, sintetizadas por proteínas que possuem ação inseticida. As toxinas são altamente específicas na sua atividade, por isso são seletivas a organismos-não alvos e não agride o meio ambiente (KRIEG e LANGENBRUCH, 1981; MONNERAT e BRAVO, 2000). Atualmente, *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *aizawai* são empregados no controle de larvas de lepidópteros. A ação do *Bt* ocorre através da ingestão de toxinas pela larva, interferindo no balanço osmótico do inseto, causando a ruptura da parede celular do intestino médio (GILL, 1995; KNAACK e FIUZA, 2006).

B. thuringiensis kurstaki (*Btk*) presente na formulação comercial Dipel® WG é recomendado para controle de *G. molesta* em maçã. As aplicações são realizadas no período de pré-colheita e colheita em função do produto não apresentar intervalo de segurança (ANDREI, 2009). O sucesso deste tratamento não foi avaliado em frutos em laboratório e campo, assim pouco se sabe sobre o efeito em larvas. A eficiência de *Btk* em tortricídeos que possuem comportamento alimentar broqueador é questionada por

Andermatt *et al.*, (1988) em estudos realizados com *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae).

Sabe-se que em larvas desfolhadoras a chance de contaminação com *Bt* é maior, pois esta ingere grande quantidade de massa foliar (REZENDE *et al.*, 1994). Entretanto, em larvas broqueadoras há dúvidas em relação à ingestão de alimento no momento da penetração, embora a larvas permaneçam sobre o fruto em média 12 h (MYERS *et al.*, 2006).

Partindo desse pressuposto, foram realizados bioensaios com o objetivo de verificar a eficiência de três formulações comerciais de *Bt* sobre *G. molesta* em maçã. O trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro foi abordado a eficiência de *Bt* em maçãs sob condições de laboratório, casa de vegetação e campo. Em laboratório e casa de vegetação foi utilizada a técnica de imersão dos frutos nas soluções de *Bt*. Em campo, foram realizados experimentos com imersão e pulverização das soluções de *Bt* nos frutos. No segundo foram realizados testes de comparação de metodologias de aplicação de *Bt* (imersão e pulverização), testes de concentração de células viáveis de *Bt* em maçã e coloração de frutos. No terceiro capítulo, foram avaliadas as persistências de toxicidade e de células viáveis de *Bt* em maçãs infestadas com *G. molesta*.

REVISÃO DE LITERATURA

A CULTURA DA MACIEIRA

A macieira *Malus domestica* Borkh pertence à família das rosáceas e está entre as quatro frutas mais consumida no mundo. Possui origem asiática e foi introduzida no Brasil na década de 20. No entanto a produção em escala comercial teve início no final da década de 60 (PETRI e LEITE, 2008). A região sul do Brasil é considerada a maior região produtora de maçã, cuja produção correspondeu a 1.274,069 toneladas da fruta na safra 2009/10 (IBGE, 2011). Essa cultura é suscetível ao ataque de vários insetos-praga, dentre eles, a mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae). Este tortricídeo é praga primária da cultura, além da macieira, mas sua ocorrência também é constada em pessegueiro, ameixeira, nectarineira, pereira e marmeleiro (SALLES, 2000).

MARIPOSA-ORIENTAL *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916)

Grapholita molesta é um lepidóptero pertencente a família Tortricidae, originário da Ásia, acredita-se que tenha sido introduzido na América do Sul através da Argentina, estabelecendo-se no Rio Grande do Sul na década de 30 e se disseminando por toda a região produtora de frutíferas de clima temperado no Brasil (SALLES, 1984). Este microlepidóptero possui hábito crepuscular. O adulto mede aproximadamente 12 mm, de coloração pardo-escuro-acinzentado e estrias de coloração branca. As fêmeas depositam seus ovos na face inferior de folhas jovens, nas brotações e sobre os frutos. As larvas possuem comportamento alimentar broqueador, pois penetra em ramos novos e frutos para se alimentar e se desenvolver no seu interior (MONTEIRO e HICKEL, 2004). Em maçã, o maior dano ocorre nos frutos, quando ao penetrar deixa um orifício de entrada e no seu interior realiza galerias, inviabilizando-o para o comércio. O local de penetração ocorre preferencialmente através do cálice e pedúnculo (MYERS *et al.*, 2006).

MONITORAMENTO E CONTROLE

O monitoramento é realizado por meio de armadilhas delta contendo difusores do feromônio sexual, que auxilia os produtores na tomada de decisão para o emprego de estratégias de controle. O nível de controle é atingido quando forem coletadas pelo menos 20 machos/armadilha (MONTEIRO e HICKEL, 2004). O controle é realizado pelo uso de inseticidas químicos que possuem uso restrito, como os piretróides, carbamatos e fosforados, devido o elevado intervalo de segurança e toxicidade de seus compostos. Estas restrições podem interferir na exportação de frutas para o mercado internacional, pois, alguns países da Europa e América do Norte, estão restringindo o uso de algumas dessas moléculas (PROTAS e SANHUEZA, 2002).

Algumas tecnologias vêm sendo utilizada de modo a reduzir os problemas de impacto ambiental como o uso de confusão sexual, inseticidas reguladores de crescimento que atuam apenas na fase larval dos insetos e inseticidas biológicos a base *Bacillus thuringiensis*.

A técnica de confusão sexual consiste no emprego do feromônio sexual produzido por fêmeas de *G. molesta*, para confundir os machos no momento do acasalamento. O feromônio é sintetizado em laboratório e aplicado via liberadores, na forma de sache ou formulações próprias para pulverização. A área do pomar fica impregnada com feromônio, fazendo com que os machos se confundam e não reconheçam as fêmeas no momento do acasalamento (VILELA e DELLA LÚCIA, 2001). O emprego desta substância que manipula o comportamento do inseto é considerado uma estratégia ambientalmente segura e atóxica, podendo ser utilizada no período de pré-colheita (CARDÉ e MINKS, 1995).

Inseticidas reguladores de crescimento de insetos (RCI), como os inibidores da síntese de quitina e os aceleradores de ecdise, também são considerados promissores, pois atuam na fase larval do inseto alvo, sendo, portanto, mais seletivos aos inimigos naturais, além de possuir menor toxicidade (ARIOLI *et al.*, 2004; NUNES e MARODIN, 2007). O seu modo de ação ocorre via ingestão do tecido da planta pulverizado (TUNAZ e UYGUN, 2004).

Bioinseticidas à base do entomopatógeno *B. thuringiensis* são considerados ferramentas importantes no manejo de controle de pragas. A formulação comercial

Dipel[®], composta pela subspécie *B. thuringiensis* var *kurstaki*, é recomendada para uso no controle de *G. molesta* no período de pré-colheita e colheita da maçã, por não possuir intervalo de segurança (ANDREI, 2009).

***Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915)**

Esta bactéria foi isolada pela primeira vez em 1901, por Ishiwata, a partir de larvas mortas de *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae) onde foi denominada como “*sotto disease bacillus*” (ALVES, 1998). Em 1911, Berliner isolou o *Bt* a partir de larvas de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) e em 1915 o descreveu pela primeira vez como *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia localizada na Alemanha, onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (GLARE e O’CALLAGHAM, 2000).

Bacillus thuringiensis uma bactéria gram-positiva que produz esporos em formatos elípticos e cilíndricos, com um esporângio não nitidamente estendido (ALVES, 1998). Durante o processo de esporulação, sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida. Essas proteínas, ou endotoxinas, vão se acumulando até formar um corpo de inclusão cristalina, de onde originou a denominação Cry (YAMAMOTO e DEAN, 2000). Essas toxinas são codificadas por genes *cry* e sua toxicidade está relacionada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto a porção C-terminal é responsável por determinar o formato estrutural do cristal (LI *et al.*, 1991).

Hofte e Whiteley (1989) classificaram as proteínas Cry segundo a combinação de sequências de aminoácidos e seu modo ação, dividindo em 14 classes diferentes, onde as quatro principais apresentavam toxinas com ação inseticida para lepidópteros, dípteros e coleópteros. Crickmore *et al.* (1998) classificaram as proteínas Cry de acordo somente com as seqüências de aminoácidos e Peferoen (1997) as separou em 17 grupos (Tabela 1).

TABELA 1 - Classificação de proteínas Cry (CRICKMORE *et al.*, 1998) e separação em 17 grupos (PEFEROEN, 1997).

PROTEÍNAS	ALVO BIOLÓGICO
Cry 1 Aa; Cry 1 Ab; Cry 1 Ac; Cry 1 Ad Cry 1 Ca; Cry 1 Ea; Cry 2 Ac; Cry 9 aa	Lepidoptera
Cry 3 Aa; Cry 3 Ca; Cry 4 Ba; Cry 7 Aa Cry 8 Aa	Coleoptera
Cry 1 Ba; Cry 1 Ia	Coleoptera e Lepidoptera
Cry 2 Aa	Coleoptera e Díptera
Cry 10 Aa	Díptera

MODO DE AÇÃO DE *B. thuringiensis*

A ação do *Bt* ocorre através da ingestão de tecido da planta contaminado com cristal de toxina, o qual não tem ação direta, sendo considerada uma pró-toxina. A sua dissolução em meio alcalino, pH acima de 7,5, ou em soluções de enzimas proteolíticas, resulta em moléculas menores onde algumas são tóxicas a insetos (ALVES, 1998). A toxina ao se ligar nos receptores das células do intestino médio vai interferir no gradiente iônico e no balanço osmótico do inseto, promovendo a ruptura da parede celular, seguida da morte do inseto (HOFTE e WHITELEY, 1989; GILL, 1995; KNAAK e FIUZA, 2006).

A alimentação do inseto após a ingestão do *Bt* causa um aumento relativo na concentração de potássio no lúmen do intestino médio, em relação à hemolinfa (HARVEY *et al.*, 1983). A morte do inseto pode ocorrer, entre outros motivos, por inanição provocada pela parada de alimentação após a infecção (HOFTE e WHITELEY, 1989).

SUBESPÉCIES DE *B. thuringiensis*

A classificação do *Bt* em subespécie é baseada nos flagelos e sua ação sobre o inseto alvo. Existem três principais subespécies de *Bt*: *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, aplicado no controle de lepidópteros na agricultura e na produção florestal, *B. thuringiensis* var. *azaiwai*, utilizado na agricultura visando o controle de lepidópteros e dípteros e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, empregados em programas de saúde pública no controle de *Aedes aegypti*, bem como, em outros dípteros (CHARNLEY, 1991).

DEGRADAÇÃO DE *B. thuringiensis* NO AMBIENTE

O *Bt* é facilmente encontrado em diversos ambientes, podendo ser isolado a partir de diferentes substratos. Nas folhas a meia-vida dos esporos pode chegar a sete meses, sendo muito menor do que no solo (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000). No entanto, para que ocorra ativação das toxinas sintetizadas pelas proteínas Cry é necessário que se encontre as condições ótimas para a sua ativação. Os cristais de proteínas Cry, presentes nas formulações comerciais de *Bt* são mais resistentes à radiação ultravioleta do que os esporos, mais ainda assim, o número de esporos viáveis tende a sofrer uma redução, diminuindo a velocidade de ação de *Bt* (POLANCZYK e ALVES, 2003). Segundo McGuire e Shasha (1990) fatores abióticos como a radiação ultravioleta, o efeito das temperaturas, o orvalho e a precipitação pluviométrica podem influenciar na ativação das toxinas de *Bt*.

IMPACTO DE *B. thuringiensis* EM ORGANISMOS-NÃO ALVOS

Alguns autores afirmam que as toxinas produzidas pelo *Bt*, por possuírem alta especificidade na sua atividade, não causam danos a insetos não-alvos, a vertebrados e ao meio ambiente (KRIEG e LANGENBRUCH, 1981; MONNERAT e BRAVO, 2000). Há

indícios de efeitos negativos de algumas subespécies de *Bt* sobre mamíferos, em laboratório. No entanto, estes resultados são variáveis (HANSEN e SALAMITOU, 2000). Glare e O'Callaghan (2000) afirmam que são raros os casos de *Bt* causando toxicidade aos inimigos naturais.

***B. thuringiensis* EM LEPIDÓPTEROS TORTRICÍDEOS**

Vários autores estudaram o efeito de *Bt* em tortricídeos que apresentam comportamento alimentar broqueador e desfolhador. Morandi Filho *et al.*, (2007) constataram mortalidade satisfatória de larvas de *Argyrotaenia sphaleropa* em folhas de videira. Monteiro e Souza (2010) avaliaram a eficiência de *Bt* no controle dos tortricídeos *Grapholita molesta* e *Bonagota salubricola* em pomar de macieira. Siqueira e Grützmacher (2005) pulverizaram *Bt* em plantas de pessegueiro e verificaram redução de danos de *G. molesta* nos ponteiros de ramos novos. Trabalhos realizados por Andermatt *et al.* (1988) testando *Bt* em maçã para o controle de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) demonstraram que não foi eficiente no controle. Já em *Choristoneura rosaceana* estudada por Smirle *et al* (2003) o *Bt* foi considerado uma alternativa viável no controle em maçã.

CAPITULO I. EFEITO DE TRÊS FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915) SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EM MAÇÃ

RESUMO: *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria que forma cristal protéico com atividade inseticida para lepidópteros. Sua ação ocorre através da ingestão de tecidos da planta contaminados. Os lepidópteros, na sua fase larval, possuem comportamento alimentar que pode interferir na quantidade de *Bt* ingerida. *Grapholita molesta* é uma larva broqueadora que se alimenta e se desenvolve no interior de ramos e frutos. *Bt* é recomendado para o controle desta larva, entretanto, os estudos não são conclusivos quanto à sua eficiência. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de três formulações comerciais de *Bt* no controle de larvas de *G. molesta* em maçã. As formulações testadas foram Dipel[®], Xentari[®] e Agree[®] (100g i.a 100L⁻¹). Os experimentos foram realizados em laboratório, casa de vegetação e pomar. Em laboratório e casa de vegetação, maçãs ‘Eva’, em ponto de maturação, foram imersas nas soluções de *Bt*; Em pomar, foi realizada a imersão e pulverização dos frutos. Após o tratamento, os frutos foram infestados com larvas de *G. molesta* neonatas. Em laboratório, as infestações ocorreram em quatro períodos: 2, 48, 96 e 144 h após o tratamento. Em casa de vegetação e pomar, as infestações foram feitas 2 h após o tratamento. As avaliações de mortalidade e preferência de penetração nos frutos ocorreram aos sete dias para o experimento em laboratório e 15 dias para casa de vegetação e pomar. As maiores médias de mortalidade verificadas em laboratório foram no tratamento Xentari[®] (22%), em casa de vegetação: Dipel[®] (43%), imersão em pomar: Agree[®] (49%) e Xentari[®] (48%) e pulverização em pomar: Xentari[®] (34%). *G. molesta* apresentou preferência por penetrar no cálice dos frutos imersos em laboratório e pulverizados em pomar e na superfície mediana, em maçãs imersas em casa de vegetação e pomar. Com base nos dados obtidos, concluiu-se que as formulações comerciais de *Bt* apresentaram eficiência insatisfatória para utilização no controle de *G. molesta* em maçã no período da colheita de maçã ‘Eva’.

PALAVRAS-CHAVE: *B. thuringiensis kurstaki*, *B. thuringiensis aizawai*, entomopatígeno, mariposa-oriental

EFFECTS OF THREE COMMERCIAL FORMULATIONS OF *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915) ON *Grapholita molesta* LARVAE (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) IN APPLE

ABSTRACT: *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is a bacterium that forms crystal protein with insecticidal activity against lepidopterans. Its action occurs through ingestion of contaminated plant tissue. The lepidopterans in its larval stage have eating behavior that may interfere in amount of *Bt* ingested. *G. molesta* is a borer larvae which feeds and develops inside branches and fruits. *Bt* is recommended for the control of larvae, however, studies are inconclusive as to its efficiency. The objective of this study was to evaluate the effect of three commercial formulations of *Bt* in the control of *G. molesta* larvae in apples. The formulations used were Dipel[®], Xentari[®] e Agree[®] (100g a.i. 100L⁻¹). The trial was carried out in laboratory, greenhouse and orchard. In laboratory and greenhouse, apples “Eva”, in maturation point, were immersed in solutions containing *Bt*; In the orchard, was held immersion and spraying of fruit. In the laboratory, the infestations occurred in four periods: 2, 48, 96 and 144 hours after treatment. In greenhouse and orchard, infestations were made 2 h after treatment. The mortality and the priority penetration site were evaluated at seven days in the laboratory and 15 days in the greenhouse and the orchard. Xentari[®] showed higher mortality rates (22%) in the laboratory and Dipel[®] 43% in the greenhouse. The mortality rates in the orchard Agree[®] showed 49% and Xentari[®] (48%) for immersed fruits and Xentari[®] 34% for sprayed fruits. The priority penetration sites of *G. molesta* larvae were verified in the calyx for immersed fruit in the laboratory and sprayed apple in the orchard and the median surface for immersed apples in the greenhouse and the orchard. The results showed low efficiency of the commercial formulations of *Bt* against *G. molesta* larvae in apples during the harvest.

KEY-WORDS: *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *aizawai*, entomopathogen, oriental fruit moth

1.1 INTRODUÇÃO

O entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Berliner, 1915) produz cristal proteico com ação inseticida para larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000). As subspécies *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e *B. thuringiensis* var. *aizawai* possuem atividade específica para lepidópteros (JOUNG e CÔTÉ, 2000). O modo de ação ocorre através da ingestão do vegetal contaminado com toxinas, promovendo o rompimento das células do intestino médio e parada alimentar seguida de septicemia (COPPING e MENN, 2000).

As formulações comerciais são recomendadas para o controle de larvas desfolhadoras e brocas. Larvas desfolhadoras consomem grande quantidade de massa foliar, principalmente após o 3º instar (REZENDE *et al.*, 1994), enquanto que larvas broqueadoras se alimentam do interior de frutos, ramos, botões florais e sementes (FERNANDES e CARNEIRO, 2009). O hábito alimentar das larvas pode influenciar na eficiência de *Bt* de acordo com a quantidade de alimento contaminado ingerido (ANDERMATT *et al.*, 1988).

Bacillus thuringiensis var. *aizawai* foi eficiente no controle da desfolhadora *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (POLANCZYK *et al.*, 2000) e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* para *Plutella xilostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (PRAÇA *et al.*, 2007). Larvas broqueadoras tortricídeas se alimentam muito pouco ao penetrarem na planta; Andermatt *et al.* (1988) sugerem que a ingestão de *Bt* seja insuficiente para sua contaminação, devido a baixa eficiência no controle de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) em maçã. Para *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae), Monteiro e Souza (2010) testaram *Bt* em pomar comercial de macieira, mas a eficiência foi avaliando em função dos danos nos frutos.

No Brasil, *G. molesta* foi introduzida em 1929, estabelecendo-se no Rio Grande do Sul. Desde então, se tornou uma das principais pragas de fruticultura de clima temperado (SALLES, 1984). Na cultura da maçã, o *B. thuringiensis* var. *kurstaki* - *Btk*, linhagem HD-I (Dipel® WG) possui registro para uso no controle de *G. molesta*. As aplicações são realizadas durante o período de pré-colheita e colheita da maçã como alternativa ao uso de inseticidas químicos, pois não possui intervalo de segurança (ANDREI, 2009). No entanto, como a larva penetra na maçã logo após a eclosão (MYERS *et al.*, 2006) a ingestão de *Bt* pode ser inferior à concentração letal.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de três formulações comerciais de *Bt* sobre larvas neonatas de *G. molesta* em maçã nas condições de laboratório, casa de vegetação e pomar.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos para determinar a eficiência das formulações comerciais de *Bt* em *G. molesta* foram conduzidos em laboratório e casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba – PR, e em dois pomares comerciais de macieira situados na Lapa- PR.

1.2.1 Tratamentos

Foram avaliados três bionseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*: Dipel® WG (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* - *Btk*, linhagem HD-I, 540 g i.a kg) (Abbott Laboratories), Xentari® WG (*B. thuringiensis* var. *aizawai* – *Bta*, 540 g i.a kg) (Abbott Laboratories) e Agree® WP (*B. thuringiensis* var. *aizawai*, linhagem GC-91 transconjugado com toxinas de *Btk*, 500 g i.a Kg) (Certis USA, LLC) na dose 100 g 100 l⁻¹ de calda. A testemunha consistiu de água destilada.

1.2.2 Criação de *Grapholita molesta*

As populações de *G. molesta* foram mantidas em salas de criação, em ambiente climatizado (22 ± 2 °C, 70±10% UR e fotofase de 16 h). As larvas foram criadas em dieta artificial à base de milho, de acordo com metodologia de Guennelon et al (1981). Adultos foram colocados em garrafas de polietileno transparentes para acasalamento e postura, sendo alimentados com dieta líquida de açúcar a 25%. Larvas neonatas, com idade de aproximadamente três horas de vida, foram utilizadas nos experimentos de laboratório, casa de vegetação e pomar.

1.2.3 Experimento em laboratório

A eficiência dos três produtos comerciais foi avaliada levando-se em consideração o seu efeito residual em maçãs ‘Eva’. Frutos maduros foram imersos nas soluções dos

tratamentos por 20 segundos. Após duas horas de secagem, em temperatura ambiente, os frutos foram colocados em recipiente de polietileno (300 mL). O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 (tratamentos) x 4 (período de infestação) e com oito repetições de cinco frutos. As infestações das neonatas ocorreram 2, 48, 96 e 144 h após a imersão, depositadas na superfície mediana de cada fruto. Foi instalada uma réplica do experimento para cada período de infestação. A mortalidade foi avaliada aos sete dias após cada período de infestação. O experimento foi conduzido em temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 16 h.

1.2.4 Experimento em casa de vegetação

Macieiras ‘Eva’ foram cultivadas em vasos de polietileno (40 l) desde 2009 e transferidas para casa de vegetação (área de 80 m²) em 2010. As plantas foram dispostas em espaçamento de 0,90 m entre plantas e 1,10 m entre linhas. O experimento foi conduzido durante a safra 2010/11. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos. Cada tratamento teve quatro macieiras como repetição, contendo, em média, oito frutos. As maçãs, em ponto de maturação, foram imersas por 20 segundos, nas soluções dos tratamentos e deixadas para secar, em temperatura ambiente, por 1 h. Três neonatas de *G. molesta* foram depositadas sobre a superfície mediana de cada fruto. A infestação ocorreu a partir das 17 h, a fim de evitar a desidratação das larvas. No 15º dia, os frutos foram colhidos e levados ao laboratório para as avaliações. As temperaturas observadas durante o período foram: mínima de 23 °C e máxima de 36 °C.

1.2.5 Experimentos em pomares de macieira

1.2.5.1. Imersão de frutos em soluções de *Bt*

A eficiência dos bioinseticidas foi verificada em pomar comercial com área de 80 ha, situado na Lapa – PR (25°40’30.72’’S, 49°39’30.24’’W) durante a safra 2010/11. Em uma quadra de macieiras ‘Eva’, de um hectare, foram selecionadas 13 plantas de uma mesma linha de plantio, com espaçamento 1,5 m entre plantas e 4,5 m entre linhas. O delineamento foi em blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada bloco foi constituído por duas plantas. Cada planta recebeu dois tratamentos, onde foram marcados 15 frutos

por tratamento (dispostos do lado direito e esquerdo da planta). Uma planta foi utilizada como bordadura entre os blocos. Os frutos foram imersos nas soluções dos tratamentos durante 20 segundos e secos por 1 h. Três larvas neonatas de *G. molesta* foram depositadas na superfície mediana das maçãs. A infestação ocorreu após as 17 h, a fim de evitar a desidratação das larvas devido ao calor. Após 15 dias, as maçãs foram colhidas e levadas ao laboratório para as avaliações. As temperaturas observadas para o período foram: mínima de 16,5 °C e máxima de 26,5 °C com precipitação média de 4,2 mm (Estação Meteorológica do IAPAR/Lapa - PR).

1.2.5.2. Pulverização de frutos com soluções de *Bt*

O experimento foi instalado em pomar comercial de 18 ha situado na Lapa – PR (25°50'13.92"S, 49°36'41.76"W) durante a safra 2010/11. Uma parcela de um hectare de macieira 'Eva' foi destinada ao experimento, implantada em 1997 no espaçamento 2,5 entre plantas e 4,5 m entre linhas. O delineamento foi em blocos ao acaso com quatro blocos, sendo, cada bloco disposto em uma mesma linha de plantio. Cada tratamento foi constituído por sete macieiras, cujas observações, foram realizadas na macieira central e as demais consideradas como bordadura, além de quatro linhas entre blocos. As soluções dos tratamentos (citados no item 1.2.1) foram pulverizadas por meio de um turbo atomizador (modelo Argos), com vazão de 1000 l ha⁻¹ até o ponto de escorrimento. A pulverização foi realizada nas primeiras horas da manhã, sem a presença de orvalho. Após 1 h de secagem, duas neonatas de *G. molesta* foram depositadas sobre a superfície mediana de cada maçã, totalizando 160 frutos em cada tratamento. As infestações ocorreram somente na macieira central de cada tratamento. Os frutos foram colhidos no 7º dia e deixados em sala climatizada para o desenvolvimento das larvas. As avaliações ocorreram a partir do 15º dia. As temperaturas registradas para o período foram: mínima de 18,6 °C e máxima de 28 °C, com precipitação média de 9,3 mm (Estação Meteorológica do IAPAR/ Lapa - PR).

1.2.6 Parâmetros avaliados

Foi avaliada a mortalidade das larvas e a preferência de penetração de *G. molesta*. A mortalidade foi quantificada fatiando as maçãs, em espessuras de 0,5 cm, até o aparecimento de uma, duas ou três larvas, dependendo do experimento (laboratório, casa de vegetação e pomar). Esse procedimento foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópico. Os indivíduos encontrados que não responderam ao toque do pincel foram considerados mortos. A preferência de penetração das larvas foi realizada observando os orifícios de entrada da larva nos frutos e a presença de dejetos ou galeria interna, quando não havia sintoma externo. Foram analisados três locais da maçã: cálice, pedúnculo e superfície mediana, considerados áreas suscetíveis de penetração (MYERS *et al.*, 2006).

1.2.7 Análise Estatística

Os dados que não apresentaram normalidade pelo teste Shapiro-Wilk foram transformados em \sqrt{x} . A análise de variância foi através do teste F ao nível de ($P \leq 0,05$) e a comparação de médias pelo teste de Fisher – LSD (Least Significant Difference), utilizando-se o software STATGRAPHICS Centurion XVI. A mortalidade de *G. molesta* nos tratamentos foi corrigida empregando-se a fórmula de Abbott (1925).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Experimento em laboratório

O efeito residual das formulações de *Bt* não apresentou diferenças quando aplicado nos quatro períodos de infestação, com exceção para Agree® a 48 horas ($F = 3,86$; $df = 3$; $P = 0,0199$) (Tabela 1.1). Comparando os tratamentos, em cada período de infestação, observou-se que as formulações comerciais de *Bt* não diferiram entre si. Na infestação realizada 2 h após a imersão, Xentari® apresentou 19,25% de mortalidade, sendo superior à testemunha (5%). Enquanto que na infestação realizada 48 h Agree® mortalidade de 39,37% diferiu da testemunha com 8,12% de mortalidade. Já no período de 96 h Agree®, Dipel® e Xentari® foram estatisticamente diferentes da testemunha.

Em relação à mortalidade corrigida de larvas de *G. molesta*, verificou-se maior mortalidade na infestação realizada 48 h após imersão dos frutos nas soluções do bioinseticidas. Agree[®] causou 33% de mortalidade nos indivíduos, enquanto que para Dipel[®] e Xentari[®] a mortalidade foi de 20% e 23%, respectivamente.

Tabela 1.1 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) de larvas de *G. molesta* infestada, em diferentes períodos, sobre frutos tratados com formulações comerciais de *B. thuringiensis* em condições de laboratório.

Tratamentos	N ¹	Horas após a imersão dos frutos nas soluções de Bt				Média Geral
		2 h	48 h	96 h	144 h	
Mortalidade (%)						
Agree [®] WP	152	7,50 ± 3,66 b B	38,12 ± 1,87 a A	15,62 ± 3,46 b AB	13,12 ± 3,89 b A	18,59 ± 2,67 A
Dipel [®] WG	157	17,50 ± 2,50 a A	26,67 ± 3,33 a A	17,50 ± 2,50 a A	20,00 ± 0,00 a A	20,42 ± 2,87 A
Xentari [®] WG	156	18,12 ± 2,66 a A	29,37 ± 4,27 a A	20,62 ± 0,62 a A	20,00 ± 0,00 a A	22,03 ± 5,24 A
Testemunha	157	5,00 ± 3,27 a B	7,50 ± 3,66 a B	7,50 ± 3,66 a B	2,50 ± 2,50 a B	5,62 ± 3,23 A
Mortalidade Corrigida (%)						
Agree [®] WP	152	3,38	33,33	8,96	10,53	14,16
Dipel [®] WG	157	13,51	20,18	10,81	17,89	15,54
Xentari [®] WG	156	10,81	23,03	14,07	17,89	16,36

¹N = números de larvas observadas; ²As médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$); ³Mortalidade Corrigida: Abbott (1925)

A percentagem média de mortalidade de larvas submetidas aos três bioinseticidas nos quatro períodos de infestação foi de 20,7%, diferindo significativamente da testemunha ($F = 5,15$; $df = 3$; $P = 0,0022$) (Tabela 1.1).

1.3.2 Experimento em casa de vegetação

A mortalidade das larvas nos tratamentos com os bioinseticidas não diferiram entre si, porém, os resultados obtidos com Dipel[®] e Xentari[®] foram significativos em relação à testemunha ($F = 3,84$; $df = 3$; $P = 0,0388$) (Tabela 1.2). A mortalidade corrigida dos indivíduos infestados em frutos tratados com Dipel[®] foi de 43,10%, enquanto que para Xentari[®] e Agree[®] a mortalidade foi de 26,67% e 23,88.

Tabela 1.2 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de *G. molesta* infestada sobre frutos tratados com as formulações comerciais de *B. thuringiensis* em condições de casa de vegetação.

Tratamentos	N ¹	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ³
Agree [®] WP	56	48,01 \pm 2,56 ab	23,88
Dipel [®] WG	58	65,69 \pm 3,03 a	43,10
Xentari [®] WG	60	51,07 \pm 2,15 a	26,67
Testemunha	66	23,01 \pm 1,41 b	

¹N = números de larvas observadas; ²As médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$); ³Mortalidade Corrigida: Abbott (1925).

1.3.3 Experimentos em pomares de macieira

1.3.3.1 Imersão de frutos em soluções de *Bt*

Em condições de pomar, os dados de mortalidade obtidos mostram que houve diferença significativa entre os tratamentos ($F = 6,71$; $df = 3$; $P = 0,0142$) (Tabela 1.3). Xentari[®] diferiu significativamente de Dipel[®] e da testemunha, porém não diferiu de Agree[®]. Os tratamentos Agree[®] e Xentari[®] apresentaram percentual de mortalidade corrigida das larvas de *G. molesta* aproximado (49,43% e 48,52%, respectivamente), enquanto que em Dipel[®] o percentual foi de 33,76%.

Tabela 1.3 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de *G. molesta* infestada sobre frutos imersos nas formulações comerciais de *B. thuringiensis* em condições de campo. Lapa – PR, 2010.

Tratamentos	N ¹	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ³
Agree WP	57	69,60 \pm 2,92 ab	49,43
Dipel WG	64	56,47 \pm 1,40 b	33,76
Xentari WG	56	69,03 \pm 0,55 a	48,52
Testemunha	78	41,03 \pm 0,12 b	

¹N = números de larvas observadas; ²As médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$); ³Mortalidade Corrigida: Abbott (1925).

1.3.3.2 Pulverização de frutos com soluções de *Bt*

A mortalidade de *G. molesta* nos frutos tratados com os inseticidas a base de *Bt* não diferiram entre si, porém, foram diferentes da testemunha ($F = 7,86$; $df = 3$; $P = 0,0036$) (Tabela 1.4). Xentari[®] apresentou maior percentual de mortalidade corrigida (33,96%) em relação ao Dipel[®] (26,91%) e Agree[®] (19,89%).

Tabela 1.4 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de *G. molesta* infestada em maçãs pulverizadas com as formulações comerciais de *B. thuringiensis* em condições de campo. Lapa – PR, 2011.

Tratamentos	N ¹	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ³
Agree WP	142	36,27 \pm 0,48 a	19,89
Dipel WG	118	41,70 \pm 0,55 a	26,91
Xentari WG	106	49,73 \pm 1,46 a	33,96
Testemunha	140	20,01 \pm 0,44 b	

¹N = números de larvas observadas; ²As médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$); ³Mortalidade Corrigida: Abbott (1925).

O local de preferência de penetração de *G. molesta* diferiu entre os quatro experimentos realizados: laboratório ($F = 100,00$; $df = 2$; $P = 0,0000$), casa de vegetação ($F = 25,12$; $df = 2$; $P = 0,0002$), imersão em pomar ($F = 23,72$; $df = 2$; $P = 0,0003$) e pulverização em pomar ($F = 21,35$; $df = 2$; $P = 0,0004$). (Figura 1.1). Nos frutos imersos em laboratório e pulverizados em pomar, *G. molesta* apresentou preferência por penetrar através do cálice (66% e 51%, respectivamente), enquanto que nos frutos imersos em casa de vegetação a maior penetração foi pela superfície mediana (53%) e nos frutos imersos em pomar houve maior preferência pelo pedúnculo (37%) e superfície mediana (44%). As formulações comerciais de *Bt* não influenciaram a preferência de *G. molesta* na penetração de maçã em relação à testemunha.

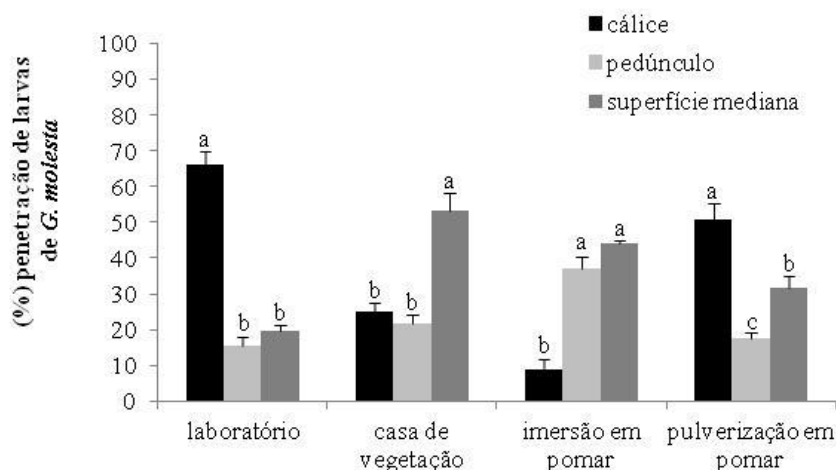


Fig. 1.1- Percentagem de larvas de *G. molesta* que penetraram nas regiões do cálice; pedúnculo e superfície mediana de maçãs tratadas com formulações comerciais de *B. thuringiensis* em experimentos realizados em laboratório, casa de vegetação e pomar (imersão e pulverização de frutos), analisados pelo teste LSD ($P \leq 0,05$).

1.4 DISCUSSÃO

A eficiência mínima de um inseticida exigida para insetos-praga que atacam a parte aérea das plantas é de 80% (EMPRAPA, 2011). Avaliando as três formulações comerciais de *Bt*, a eficiência foi considerada baixa nos testes realizados em laboratório, casa de vegetação e pomar, pois apresentaram porcentagem de controle inferior a 50%. O *Bt* precisa ser ingerido para ser bioativado no intestino médio de larvas e a concentração de esporos e toxinas consumidos tem relação com a eficiência para larvas desfolhadoras (ALVAREZ *et al.*, 2011). *G. molesta* é uma larva broqueadora que penetra no fruto permanecendo durante quase todo o ciclo no seu interior (SOUZA *et al.*, 2000). Este tipo de hábito alimentar pode dificultar a ingestão de tecido do fruto contaminado com *Bt*, pois, após a eclosão, a larva permanece pouco tempo sobre o fruto, a fim de evitar perda de líquidos, garantindo sua sobrevivência. Nesta fase de neonata, *G. molesta* pode nem chegar a consumir alimento durante a penetração.

O formato do fruto também pode interferir na eficiência de *Bt*. No caso da maçã, o fruto possui regiões que podem servir de proteção para larvas broqueadoras. Larvas que penetram através do cálice, podem entrar no fruto sem precisar se alimentar durante a penetração. Ao analisar esta região no fruto, se observa que ela possui uma cavidade na parte interna em forma de funil, cuja abertura é protegida por sépalas. A larva se dirige através dessa passagem diretamente para o interior do fruto, sem necessidade de

alimentação, ficando protegida da ação de produtos fitossanitários. As larvas que penetram através do pedúnculo e a superfície mediana possuem maior probabilidade de ingerir tecido da planta contaminado durante a penetração. Nos testes realizados em casa de vegetação a maior preferência de penetração foi verificada através da superfície mediana (53%) e em imersão em pomar na superfície mediana e pedúnculo (44 e 37%). Essa preferência pode estar relacionada com a maior mortalidade nesse experimento em relação aos demais. Entretanto, nos testes em laboratório e pulverização de *Bt* em pomar, observou-se que a maior preferência de penetração foi no cálice (51 e 66%). Esse resultado pode explicar a baixa mortalidade obtida nestes experimentos em relação aos testes mencionados anteriormente.

Neste sentido, a baixa mortalidade sugere que a larva não se alimenta suficientemente como as larvas desfolhadoras, devido a seu hábito alimentar. Andermatt et al. (1988) mostraram que *Bt kurstaki* apresentou maior mortalidade em *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) quando esta se alimentou de maçãs fatiadas, ao contrário das larvas depositadas sobre frutos inteiros.

Trabalhos realizados com outros tortricídeos que se alimentam da superfície dos frutos e folhas demonstraram que *Bt* foi eficiente no controle. Morandi Filho et al (2007) testaram *Bt kurstaki* em *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) em folhas de videiras. Monteiro e Souza (2010) observaram eficiência de *Bt kurstaki* sobre *Bonagota salubricola* (Lepidoptera: Tortricidae) em pomar de macieira. A alta eficiência se deve ao hábito alimentar destas larvas, pois se alimentam de folhas e da superfície dos frutos, o que não acontece com *G. molesta*.

Além da forma como o alimento é consumido pelas larvas de *G. molesta* fatores abióticos também podem ter influenciado na baixa eficiência de *Bt* nos experimentos em casa de vegetação e pomar. Fatores como incidência de radiação ultravioleta, temperatura, orvalho e precipitação podem interferir na velocidade de ação do *Bt*, embora os cristais proteicos sejam mais resistentes que os esporos (POLANCZYK e ALVES, 2003; MCGUIRE e SHASHA, 1990). Cabe ressaltar que não ocorreram precipitações pluviométricas nos dias das instalações dos experimentos. Fatores abióticos podem influenciar somente no dia da instalação do experimento, pois segundo Myers et al., (2006) *G. molesta* leva em média 12 h para penetrar no fruto e nesse período ela fica muito suscetível a esses fatores, após esse período ela permanecerá protegida no fruto durante quase todo o ciclo.

A mortalidade de larvas na testemunha nos testes conduzidos em casa de vegetação e pomares foi maior que no laboratório, provavelmente por fatores como estresse ou desidratação, pois, a larva recém eclodida é muito pequena e frágil, perde líquido com muita facilidade. Para minimizar esses fatores as infestações foram realizadas no final da tarde para os experimentos em casa de vegetação e imersão em pomar e no período da manhã no experimento de pulverização em pomar.

1.5 CONCLUSÕES

As formulações comerciais Agree[®], Dipel[®] e Xentari[®] apresentaram baixa eficiência na mortalidade de *G. molesta*, nas condições experimentais estudadas, em laboratório, casa de vegetação e pomar no período da colheita.

1.6 REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.

ALVAREZ, A.; VIRLA, E. G.; PERA, L. M.; BAIGORI, M. D. Biological characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains toxic against *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2343–2349, 2011.

ANDERMATT, M., MANI, E., WILDBOLZ, T., LÜTHY, P. Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 49, p. 291–295, 1988.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícola**. 8.ed. São Paulo: Edição do autor, 2009. 1380 p.

COPPING, L. G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, n. 5, p. 651-676, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Normas para avaliação e para a indicação de inseticidas**. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/rcbptt/2rcbptt/pdf/8%20anexo%20I/normas%20inseticidas.pdf>>. Acesso em: 10 Jan 2011.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 2000. 350 p.

GUENNELON, G.; AUDEMARD, H.; FREMOND, J.C.; ABDELMAJID, E.M.; AMMARI, I. Progrès réalisés dans l' élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. **Agronomie**, v. 1, n.1, p. 59 – 64, 1981.

FERNANDES, G. W.; CARNEIRO, M. A. A. **Insetos Galhadores**. In: PANIZZZI, A. R; PARRA, J. X Congresso de Ecologia do Brasil, 16 a 22 de Setembro de 2011, São Lourenço - MG 2R. P. (Org.). Bioecologia e Nutrição de Insetos como Base para o Manejo Integrado de Pragas. Brasília: CT- Agro/CNPq, p. 597 – 640, 2009.

JOUNG, K.; CÔTÉ, J. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Quebec: **Horticultural Research and Development Centre**, 2000. (Technical Bulletin, n. 29).

MCGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 1813-1817, 1990.

MONTEIRO, L. B.; SOUZA, A. Controle de Tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em Fraiburgo – SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 423-428, 2010.

MORANDI FILHO W.J.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; ZANARDI, O.Z. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e inseticidas químicos no controle de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) em Videira. **Arquivos Instituto Biologia**, Campinas, v. 74, p. 129-134, 2007.

MYERS, C.T.; HULL, L.A.; KRAWCZYK. G. Seasonal and cultivar associated variation in the oviposition preference of oriental fruit moth, (Lepidoptera: Tortricidae) adults and feeding behavior of neonate larvae in apples. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 99, n. 2, p. 349-358, 2006.

POLANCZYK, R.A.; SILVA, R. F. P. DA; FIUZA, L.M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 2000, n. 31, p. 165-167, 2000.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montevideo, v. 7, p. 1-10, 2003.

PRAÇA, L.B.; RAMOS, R.R.; OLIVEIRA, F.W.; SOARES, C.M.; SUJII, E.; MONNERAT, R.G. **Avaliação da Suscetibilidade da *Plutella Xylostella* (Traça das crucíferas) a produtos a base de *Bacillus Thuringiensis* e Deltametrina em cultivo de repolho o Distrito Federal.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 15 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 176).

REZENDE, M.A.A.; CRUZ, I.; DELLA LUCIA, T.M.C. Consumo foliar de milho e desenvolvimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) parasitadas por *Chelonus insularis* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n. 3, p. 473-478, 1994.

SALLES, L. A. B. **Grafolita (*Grapholita molesta*) bioecologia e controle.** Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1984. 16 p. (Documentos, 20).

SALLES, L. A. B. **Grafolita (*Grapholita molesta*): bioecologia e controle.** Pelotas: EMBRAPA-CNPFT. 1991. 13p. (Documentos, 42).

SOUZA, B.; SANTA-CECÍLIA, C. V. L.; SOUSA, V. O. L. Ocorrência e Danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em Pessegueiros no Município de Caldas, MG. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p. 185-188, 2000.

CAPITULO II. ANÁLISE DE METODOLOGIAS DE APLICAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* EM MAÇÃ NA MORTALIDADE DE LARVAS DE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EM LABORATÓRIO

Resumo O *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*) é um inseticida biológico recomendado para o controle de *Grapholita molesta* em maçã. Entretanto, alguns autores questionam a sua eficiência. Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar a eficiência dos métodos de aplicação de *Btk* em maçã no controle de *G. molesta*. A formulação comercial utilizada foi Dipel[®] WG (dose 100 g i.a 100 l⁻¹) + surfactante Ag-Bem[®] (dose 50 ml i.a 100 l⁻¹). Os experimentos instalados foram: i) influência da adição de surfactante: maçãs ‘Eva’ foram imersas em solução de Dipel[®], com surfactante e sem surfactante. Após a secagem, cada fruto recebeu uma larva neonata de *G. molesta*. Foi avaliada a mortalidade e a preferência de local de penetração de larvas no fruto aos sete dias. ii) Influência dos métodos de aplicação de Dipel[®]: tratamento 1: pulverização; tratamento 2: imersão, tratamento 3: imersão + injeção; tratamento 4: testemunha. As maçãs receberam aplicação de Dipel[®] por 20 segundos e a testemunha foi imersa em água destilada + surfactante. Cada fruto foi infestado com uma larva neonata e avaliado a mortalidade aos sete dias. iii) Teste de coloração nos frutos: frutos foram submetidos a aplicação de solução de corante sob diferentes métodos: Tratamento 1: pulverização; tratamento 2: imersão; tratamento 3: imersão + injeção de solução de corante no cálice e pedúnculo da maçã. A avaliação foi realizada pela observação e classificação da coloração em três níveis: 1= totalmente colorido, 2= parcialmente colorido e 3= não colorido; iv) Concentração de células viáveis de *Btk* (Dipel[®]) no cálice, pedúnculo e superfície mediana do fruto: a bactéria foi recuperada e inoculada em meio Luria-Bertani. As contagens de colônias ocorreram 24 h após o período de incubação das amostras. Os resultados obtidos foram: i) não houve diferença entre Dipel[®] com surfactante e sem surfactante na mortalidade de *G. molesta*. Larvas de *G. molesta* tem preferência por penetrar através do cálice da maçã; ii) os métodos de aplicação de Dipel[®] não diferiram entre si na mortalidade de *G. molesta*; iii) o cálice apresentou maior número de amostras não coloridas no método de imersão; iv) A maior concentração de células viáveis de *Btk* foi observada no cálice. Conclui-se que não houve influência das metodologias de aplicação na eficiência de *Btk* sobre larvas de *G. molesta* em maçã.

Palavras – chave Dipel[®], *Bt kurstaki*, entomopatógeno, mariposa-oriental, bioinseticida

ANALYSIS OF APPLICATION METHODS OF *B. thuringiensis* IN APPLE IN MORTALITY FOR *Grapholita molesta* (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) IN LABORATORY

Abstract - *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) is a biological insecticide recommended for control of *Grapholita molesta* in apples however some authors question its efficiency. This study aimed to compare application methods of *Btk* in the control of *G. molesta* in apple. The commercial formulation used was Dipel® WG (dose tested 100g a.i. 100 l⁻¹) and Ag-Bem® surfactant (50 ml a.i. 100 l⁻¹). The evaluations were: i) influence of the addition of surfactant: apples 'Eva' were immersed in solution containing Dipel® plus surfactant and without it. After drying, each fruit received one neonate larva of *G. molesta*. The mortality and the priority penetration site of larvae in the fruit were observed at seven days. ii) Influence of *Btk* application methods: fruits were sprayed, immersed and immersed + injected with solution of Dipel® plus surfactant. Dipel® was applied to the apples for 20 seconds and distilled water was use as control. Each fruit was infested with one neonate larva and mortality was evaluated at seven days. iii) Quality of Dipel® applications: fruits were sprayed, immersed and immersed + injected with water-based blue dye in apple calyx and peduncle. Observation and classification of color in three levels were carried on: 1 = full color, 2 = partially colored and 3 = uncolored; iv) the concentration of viable cells of *Btk* (Dipel®) in the cup, stalk and median surface of the fruit: the bacteria was recovered and inoculated into Luria-Bertani medium. After 24 h of incubation of the samples the colonies were counted. The results were: i) there was no difference between Dipel® plus surfactant and without it in mortality of *G. molesta* larvae. *G. molesta* larvae prefer to penetrate through the apple cup ii) the application methods of Dipel® did not differ in mortality of *G. molesta* iii) the apple cup had a higher number of unstained samples in immersion method; iv) The highest concentration of viable cells of *Btk* was observed in the cup. The trial showed there was no influence of the application methods in the efficiency of *Btk* on *G. molesta* in apples.

key - Words - Dipel®, *Bt kurstaki*, entomopathogen, oriental moth fruit, biological insecticide

2.1 INTRODUÇÃO

A mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) é praga primária na cultura da macieira. Na fase larval possui comportamento alimentar broqueador, penetrando nos frutos logo após a eclosão para se desenvolver, fazendo galerias em direção à semente (SOUZA *et al.*, 2000). Estas possuem o hábito de penetrar através do cálice, pedúnculo e superfície mediana. A estrutura do cálice permite que a larva fique protegida da ação de produtos fitossanitários, podendo influenciar na ação de inseticidas que atuam por ingestão (MYERS *et al.*, 2006).

O inseticida biológico *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) (Berliner, 1915) (Dipel®) precisa ser ingerido pelas larvas para a ativação das endotoxinas no intestino médio. A toxina age na parede celular e altera o balanço osmótico, provocando sua morte (NAAK e FIUZA, 2006; GILL, 1995). Esta formulação é recomendada para o controle de *G. molesta* em maçã durante a pré-colheita e colheita, em função ausência de intervalo de segurança (ANDREI, 2009).

Estudos realizados com *Btk* em maçã demonstraram resultados insatisfatórios no controle dos tortricídeos, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (REISSIG *et al.*, 1984; DE REEDE *et al.*, 1985; ANDERMATT *et al.*, 1988) e *G. molesta* (M. F. PAIXÃO, dados não publicados). A maçã possui uma cutícula cerosa que pode dificultar a adesão de esporos e cristais de toxinas sobre a superfície do fruto (SCHERRER-MONTERO *et al.*, 2009). Os produtores adicionam surfactantes à solução de inseticida visando aumentar as propriedades de dispersão dos ingredientes ativos e melhorar sua aderência no fruto (HANZEN, 2000), porém, para *Btk*, não há esta recomendação pelo fabricante (ANDREI, 2009).

A eficiência de inseticidas que atuam por ingestão pode ser avaliada por diferentes métodos de aplicação. Em laboratório, os frutos são imersos nas soluções de inseticidas (NETO e SILVA *et al.*, 2011) ou pulverizados (ANDERMATT *et al.*, 1988; MORANDI FILHO *et al.*, 2007), enquanto que, em pomar, são pulverizados (JAASTAD *et al.*, 2001; MONTEIRO e SOUZA, 2010). Estes bioensaios mostraram resultados conflitantes e o método de aplicação pode ser um fator que influencia a ação de *Btk* sobre tortricídeos broqueadores.

Assim, o objetivo do estudo foi verificar a eficiência de *Btk* comparando diferentes métodos de aplicação em maçã para controle de larvas de *G. molesta*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba e no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Agrônômico do Paraná, em Londrina - PR.

2.2.1 Criação de insetos

Adultos, provenientes de populações mantidas em laboratório, foram liberados em garrafas de polietileno (PET) transparentes para oviposição. Estes foram alimentados com dieta líquida a base de açúcar a 25%. Larvas foram multiplicadas em dieta artificial à base de milho de acordo com metodologia de Guennelon *et al.*, (1981), em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 16 h. Larvas neonatas, de até três horas de vida, foram utilizadas nos experimentos.

2.2.2 Influência da adição de surfactante

A avaliação de *Bt* foi realizada com Dipel[®] WG (*B. thuringiensis kurstaki*, linhagem HD-I, 540g i.a/ kg) - *Btk* (Abbott Laboratories), na concentração de 100g de i.a. 100 L^{-1} . Os tratamentos utilizados neste experimento foram: tratamento 1: Dipel[®] + surfactante Ag-Bem[®] (Dow AgroSciences Industrial Ltda.) na dose $50 \text{ mL } 100 \text{ L}^{-1}$; tratamento 2: Dipel[®]; tratamento 3: água destilada + surfactante (testemunha); tratamento 4: água destilada (testemunha). As maçãs 'Eva', maduras, foram imersas nas soluções com os respectivos tratamentos, durante 20 segundos e secas por 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente, foram colocadas em recipientes de polietileno (300 mL) e infestadas com uma larva de *G. molesta*, depositada na superfície mediana de cada fruto. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (tratamentos) x 2 (com e sem adição de surfactante) com 12 repetições de cinco frutos. Os frutos ficaram acondicionados em sala climatizada em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 16 h. A mortalidade foi avaliada aos sete dias após a imersão. Os dados foram obtidos fatiando as maçãs, em espessuras de aproximadamente 0,5 cm, até o aparecimento da larva. Indivíduos que não responderam ao toque do pincel foram considerados mortos. Esse procedimento foi realizado com auxílio de microscópio

estereoscópico. A preferência de penetração das larvas nas maçãs foi quantificada de acordo: cálice, pedúnculo e superfície mediana.

2.2.3 Influência dos métodos de aplicação de *Bt*

Dipel® (100 g de i.a. 100 l⁻¹) acrescido de surfactante (50 ml 100 l⁻¹) foi testado em larvas de *G. molesta* sobre maçãs 'Eva'. Os tratamentos foram: tratamento 1: pulverização; tratamento 2: imersão; tratamento 3: imersão + injeção; tratamento 4: testemunha (água destilada + surfactante). No tratamento 1, os frutos foram pulverizados individualmente, por meio de um pulverizador manual (500 ml) por 20 segundos, chegando ao ponto de escorrimento. No tratamento 2, os frutos foram imersos na solução de inseticida por 20 segundos. No tratamento 3, foi realizada a imersão dos frutos por 20 segundos na solução e injetado 1 ml da mesma solução dentro do cálice da maçã e no pedúnculo. No tratamento 4, as maçãs foram imersas em água destilada + surfactante por 20 segundos. Todos os frutos foram transferidos para recipientes de polietileno (300 ml) após 2 h de secagem. Uma larva de *G. molesta* foi depositada na superfície mediana de cada maçã. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 16 repetições de dois frutos. A mortalidade foi avaliada sete dias após a infestação. O experimento foi conduzido em sala climatizada em temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotofase de 16 h. O parâmetro avaliado foi à mortalidade conforme metodologia descrita no item 2.2.2.

2.2.4 Teste de coloração dos frutos

A qualidade da aplicação de *Bt* foi avaliada observando-se o acúmulo de corante no cálice e pedúnculo. A solução foi preparada adicionando-se 42 ml de corante azul a base d'água (marca TC 42 Pilot) em 1 l de água destilada. Os tratamentos foram: tratamento 1: pulverização; tratamento 2: imersão e tratamento 3: imersão + injeção da solução de corante no cálice. No tratamento 1, as maçãs foram pulverizadas individualmente, por meio de um pulverizador manual (500 ml) por 20 segundos, chegando ao ponto de escorrimento. No tratamento 2, as maçãs foram imersas na solução de corante por 20 segundos e no tratamento 3, as maçãs foram imersas por 20 segundos na solução de corante e em seguida, foi injetado 1 ml da solução de corante no cálice e pedúnculo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições

de três frutos. Para a avaliação, os frutos foram divididos ao meio, longitudinalmente, para verificar o teor de corante impregnado nos tecidos do cálice e pedúnculo, sob microscópio estereoscópico. A intensidade dos corantes foi definida em três níveis: 1= paredes internas coloridas (100%); 2= parcialmente coloridas ($\pm 50\%$); 3= não coloridas (0%).

2.2.5 Concentração de células viáveis de *Bt kurstaki* em maçã

A concentração de *Btk* foi determinada em três locais de penetração de *G. molesta* em maçã: cálice, pedúnculo e superfície mediana. Maçãs maduras foram imersas em solução de *Btk* por 20 segundos e secas por 2 h. A testemunha consistiu de frutos imersos em água destilada. O cálice, pedúnculo e superfície mediana da maçã foram destacados dos frutos com o auxílio de um furador de rolha (18 mm de diâmetro) e colocados, individualmente, em sacos plásticos contendo 50 mL de solução tampão fosfato, submetidos à agitação (150 rpm) por 2 h a 27°C. Os conteúdos líquidos foram transferidos para tubos Falcon (50 ml) e centrifugados (5000 rpm) por 10' à 20°C. O sobrenadante líquido foi descartado, adicionando-se ao pellet 5 ml de água autoclavada. Os tubos foram ressuspensos em vortex e deixados em banho-maria por 20' a 80°C. O delineamento foi inteiramente casualizado com 10 repetições para cada local do fruto. Alíquotas de 1 ml foram retiradas de cada amostra para a realização da diluição em série (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura Luria-Bertani (LB) receberam 100 μ l de cada diluição. As amostras permaneceram incubadas a 30°C durante 24 h. Após este período foi feita a contagem de colônias bacterianas, através de um contador de colônias manual, onde cada colônia foi marcada com uma caneta de retroprojektor de ponta fina. As colônias foram ajustadas para unidades formadoras de colônias (UFC) por local do fruto, expressas em \log_{10} UFC/ml, onde cada UFC correspondeu a uma célula viável de *Btk*.

2.2.6 Análise Estatística

Os dados que não apresentaram normalidade foram transformados em \sqrt{x} . Utilizou-se análise de variância pelo teste F ao nível de ($P \leq 0,05$) e comparação de médias pelo teste de Fisher – LSD (Least Significant Difference), através do software

STATGRAPHICS Centurion XVI. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de Abbott (1925).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Influência da adição de surfactante

Os dados obtidos na mortalidade dos indivíduos de *G. molesta* nos tratamentos Dipel® com adição de surfactante e Dipel® sem adição de surfactante não diferiram estatisticamente entre si. Houve diferença apenas em relação à testemunha ($F = 25,09$; $df = 1$; $P = 0,0000$) (Tabela 2.1). A mortalidade corrigida das larvas submetidas ao tratamento com Dipel® sem adição de surfactante foi superior (24,19%) a Dipel com adição de surfactante (13,98).

Tabela 2.1 Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de *G. molesta* em maçãs imersas em Dipel® com e sem adição de surfactante.

Tratamentos	N ¹	Com adição de surfactante		Sem adição de surfactante	
		Mortalidade (%)	MC ² (%)	Mortalidade (%)	MC (%)
Dipel® WG	114	16,67 \pm 4,14 a A	13,98	25,83 \pm 6,48 a A	24,19
Testemunha	118	3,33 \pm 2,25 a B		1,67 \pm 1,67 a B	

¹ número de larvas observadas; ² MC = Porcentagem de mortalidade Corrigida (Abbott, 1925). ³ As médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$);

A preferência de penetração de larvas de *G. molesta* em maçã foi significativa para Dipel® ($F = 47,05$; $df = 2$; $P = 0,0000$) e testemunha ($F = 52,43$; $df = 2$; $P = 0,0000$) (Tabela 2.2), mostrando que a maior parte das penetrações ocorreram no cálice. Entre os tratamentos, houve diferença na superfície mediana ($F = 7,89$; $df = 1$; $P = 0,0073$), mostrando que *G. molesta* apresentou maior preferência pela superfície mediana em frutos tratados com Dipel®. Em torno de 5% de larvas não foram encontradas nos frutos durante a avaliação.

Tabela 2.2 Percentagem média de mortalidade (\pm EP) de larvas de *G. molesta* que penetraram no cálice, pedúnculo e superfície mediana de maçãs imersas em Dipel® e água destilada.

Tratamentos	N ¹	Locais da maçã (%)		
		Cálice	Pedúnculo	Superfície mediana
Dipel® WG	120	72,50 \pm 3,77 a A	6,67 \pm 2,60 c A	20,83 \pm 2,55 b A
Testemunha	120	76,67 \pm 5,73 a A	9,17 \pm 2,94 b A	13,33 \pm 3,93 b B

¹ N = número de frutos observados; ² As médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$);

2.3.2 Influência dos métodos de aplicação de *Bt*

Os métodos de pulverização, imersão e imersão + injeção de Dipel® na maçã não apresentaram diferença nas médias de mortalidade de *G. molesta*, porém diferiram estatisticamente da testemunha ($F = 4,53$; $df = 3$; $P = 0,0063$) (Tabela 2.3). A mortalidade corrigida foi semelhante nos três métodos de aplicação de Dipel®, ao redor de 33%. As larvas não encontradas durante o corte das maçãs representaram 8%.

Tabela 2.3 Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de *G. molesta* em maçãs tratadas com Dipel® com diferentes métodos de aplicação.

Tratamentos	N ¹	Mortalidade (%)	Mortalidade Corrigida (%)
Imersão em Dipel®	88	24,10 \pm 4,06 A	13,31
Imersão+ injeção de Dipel®	88	30,70 \pm 4,08 A	23,92
Pulverização com Dipel®	89	31,52 \pm 2,84 A	26,51
Imersão em água	89	13,47 \pm 2,11 B	
Imersão+injeção de água	90	8,89 \pm 3,63 B	
Pulverização com água	89	6,94 \pm 3,13 B	

¹ N = número de larvas observadas; ² As médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste LSD ($P \leq 0,05$).

2.3.3 Teste de coloração dos frutos

Os níveis da intensidade de coloração no cálice foram significativos em imersão + injeção ($F = 3,50$; $df = 2$; $P = 0,0488$), mostrando que a injeção da solução coloriu 100% das amostras, enquanto que os demais tratamentos apresentaram algumas amostras com ausência de coloração no cálice. O método de imersão foi o que apresentou o maior número de frutos sem presença de corante (Tabela 2.4). No pedúnculo, houve maior concentração de corante nos tratamentos pulverização ($F = 6,73$; $df = 2$; $P = 0,0055$) e imersão + injeção ($F = 21,50$; $df = 2$; $P = 0,0000$). O nível 3 diferiu entre os tratamentos ($F = 3,96$; $df = 2$; $P = 0,0348$), onde não foi verificado presença de frutos no nível 3 no tratamento imersão + injeção (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 Percentagem média de maçãs (\pm EP) que apresentaram diferentes níveis de corante no cálice e pedúnculo após três métodos de aplicação.

Tratamentos	N ¹	Níveis de coloração após aplicação de corante (%) ²		
		Nível 1	Nível 2	Nível 3
		Cálice		
Pulverização	8	37,50 \pm 18,30 a A	50,00 \pm 18,90 a A	12,50 \pm 12,50 a AB
Imersão	8	25,00 \pm 16,37 a A	25,00 \pm 16,37 a A	50,00 \pm 18,90 a A
Imersão + injeção	8	50,00 \pm 18,90 a A	50,00 \pm 18,90 a A	0,00 \pm 0,00 b B
		Pedúnculo		
		Nível 1	Nível 2	Nível 3
		Cálice		
Pulverização	8	75,00 \pm 16,37 a A	12,50 \pm 12,50 b A	12,50 \pm 12,50 b A
Imersão	8	37,50 \pm 16,37 a A	50,00 \pm 16,90 a A	12,50 \pm 11,18 a A
Imersão + injeção	8	87,50 \pm 12,50 a A	12,50 \pm 12,50 b A	0,00 \pm 0,00 b A

¹ Número de frutos observados; ² Níveis de coloração classificados em: nível 1= totalmente colorido, nível 2= parcialmente colorido, nível 3= não colorido; ³ As médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$);

2.3.4 Concentração de células viáveis de *Bt kurstaki* em maçã

As médias de contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bt kurstaki* foram significativamente diferentes nos três locais da maçã: cálice, pedúnculo e a superfície mediana ($F = 450,46$; $df = 5$; $P = 0,000$) (Figura 2.1). O cálice apresentou maior concentração de UFC de *Bt kurstaki* por fruto (4,55 \log_{10}), seguida do pedúnculo com 3,71 \log_{10} UFC de *Bt kurstaki* por fruto e a superfície mediana da maçã com 3,10 \log_{10} UFC de *Bt kurstaki* fruto. A testemunha, onde os frutos foram submetidos à imersão em água destilada, não foi observado presença de células bacterianas.

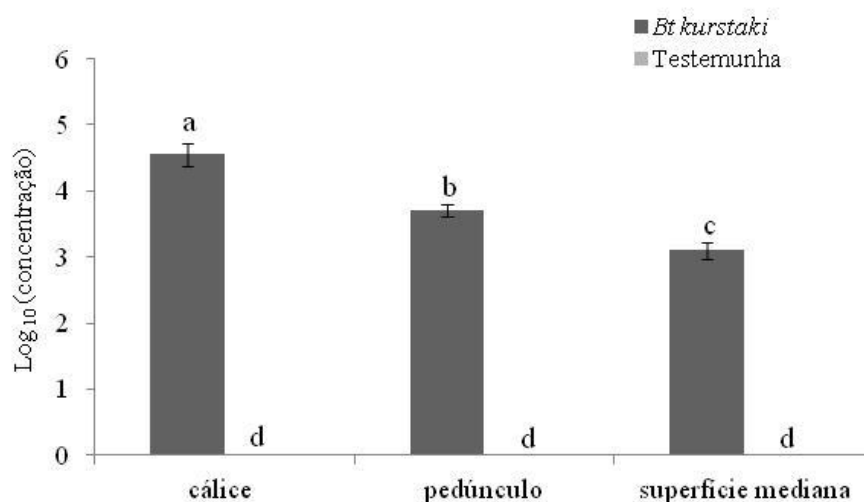


Figura 2.1 Concentração (média \pm EP) de *B. thuringiensis kurstaki* – (Dipel®) no cálice, pedúnculo e superfície mediana da maçã analisadas através do teste LSD ($P \leq 0,05$).

2.4 DISCUSSÃO

O uso de Dipel® para o controle de *G. molesta* é recomendado em macieira no Brasil, apesar de haver uma suspeita da sua eficiência (ANDREI, 2009). As aplicações são realizadas durante a pré-colheita e colheita da maçã por ser um produto que não possui intervalo de segurança. Estudos de avaliação da eficiência de Dipel® mostraram mortalidade de *G. molesta* inferior a 50% em maçã, não sendo viável a sua aplicação no campo na concentração recomendada pelo fabricante (M. F. PAIXÃO, dados não publicados). Procurando investigar os fatores que contribuíram para esta baixa mortalidade, foram realizados estudos envolvendo diferentes métodos de aplicação de Dipel® no fruto.

Embora os produtores adicionem surfactantes aniônicos na solução de inseticidas, na expectativa de promover uma melhor distribuição e adesão do ingrediente ativo sobre o fruto, os dados mostraram que este procedimento não aumentou a mortalidade de *G. molesta*. Este resultado também foi observado por Siqueira e Grutzmacher (2005).

A comparação dos métodos de pulverização, imersão e imersão + injeção de *Btk* no cálice não melhoraram a eficiência da formulação Dipel®. Essa eficiência insatisfatória talvez não esteja relacionada com a qualidade da cobertura ou adesão de Dipel® no fruto, mas com o comportamento alimentar da larva.

Analizando a preferência de penetração das larvas na maçã observou-se que o cálice foi o local onde houve maior penetração (70%), resultado também constatado por Myers *et al.*, (2006), quando avaliaram diferentes cultivares de maçã. A abertura do cálice é protegida por sépalas, que provavelmente impedem a passagem de soluções durante a pulverização. Além dessa proteção, o cálice apresenta em seu interior uma estrutura em forma de funil, que pode facilitar a passagem de larvas broqueadoras por um canal que leva direto para o interior do fruto, sem a necessidade de alimentação, bastando fazer apenas um pequeno orifício de entrada (observação pessoal).

Comparando os níveis de coloração, por meio de aplicação de corante, observou-se que o cálice foi à estrutura que apresentou menor acúmulo de corante, mostrando a dificuldade de contato de produtos fitossanitários nesta estrutura. Para melhorar a qualidade de contato da solução *Btk* com o cálice foi necessário haver uma injeção dirigida para o interior, entretanto isso não é viável no campo. O teste de imersão foi o método que apresentou maior quantidade de amostras que não receberam corante no interior do cálice. É possível que ao imergir os frutos na solução tenha ocorrido a formação de bolha de ar na cavidade do cálice, impedindo a entrada de produto através das sépalas.

Embora o interior do cálice tenha recebido cobertura parcial de produto, a estrutura completa, na qual compreende as sépalas, apresentou maior número de células viáveis de *Btk* em relação ao pedúnculo e superfície mediana. Essa maior concentração obtida se deve ao tamanho da amostra destacada do fruto, ou seja, a área isolada nesta região compreendeu não somente a cavidade do cálice, como também a parte externa das sépalas e uma borda da epiderme, pois é através desta região que a maioria das larvas de *G. molesta* penetra. A baixa concentração de células de *Btk* na superfície mediana da maçã se deve a camada cerosa que a cutícula possui (SCHERRER-MONTERO *et al.* 2009), dificultando a aderência de *Btk* neste local.

Considerando que no tratamento imersão + injeção de solução de *Bt* no cálice foi observada baixa mortalidade de larvas e que o cálice foi a região que apresentou maior concentração de *Btk*, resta saber se larvas neonatas de *G. molesta* se alimentam de tecidos contaminados com *Btk* quando penetram por esta região. Alguns autores sugerem que a baixa eficiência de *Btk* pode estar relacionada com o comportamento alimentar de *G. molesta* (SIMPSON, 1903; BOVEY, 1966; GARCIA e TOUZA, 1969; ANDERMATT *et al.*, 1988). A larva no interior do cálice pode ter acesso ao carpo sem ter se alimentado por tecidos contaminados com *Btk*. Esta hipótese é reforçada por

Andermatt et al. (1988), que ao analisarem o intestino médio de larvas de *C. pomonella* após penetração em maçãs pulverizadas com *Btk* e carvão ativado. Resultados insatisfatórios também foram encontrados por Neto e Silva *et al.*, (2011) em testes realizados com maçãs imersas em inseticidas reguladores de crescimento que atuam por ingestão. Esta análise sugere que a eficiência de Dipel® é influenciada pelo comportamento alimentar de *G. molesta*.

2.5 CONCLUSÕES

- A presença de surfactante Ag-Bem® na solução contendo Dipel®, em maçã, não alterou a mortalidade de *Grapholita molesta*.
- A maioria as larvas de *Grapholita molesta* penetraram através do cálice da maçã.
- Os métodos de aplicação de Dipel® em maçã não influenciaram na mortalidade de *Grapholita molesta*.
- As intensidades de coloração no cálice e pedúnculo após o método de imersão + injeção foram maiores do que nos de pulverização e imersão.
- A concentração de células viáveis de *Bt kurstaki* foi maior no cálice do que no pedúnculo e superfície mediana da maçã.

2.6 REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.

ANDERMATT, M., MANI, E., WILDBOLZ, T., LÜTHY, P. Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 49, p. 291–295, 1988.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícola**. 8.ed. São Paulo: Edição do autor, 2009. 1380 p.

BOVEY, P. Super-famille des Tortricidae: Le Carpocapse ou ver des pommes et poires. En: Balachowsky, A.S., (Eds). **Entomologie appliqué à l'agriculture**. Masson, Paris, v. 2, n. 1, p. 653-734, 1966.

DE REEDE, R. H.; GRUYS, P.; VAAL, F. Leafrollers in apple IPM under regimes based on *Bacillus thuringiensis*, on Diflubenzuron, or on epofenonane. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 37, p. 263-274, 1985.

GARCIA, M. F.; TOUZA, E. E. **Bioecología de *Grapholita molesta* Busck y sistema de alarma**. Buenos Aires: INTA, 1969. 8p.

GILL, S. S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 69-74, 1995.

GUENNELON, G.; AUDEMARD, H.; FREMOND, J.C.; ABDELMAJID, E.M.; AMMARI, I. Progrès réalisés dans l' élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie*, v. 1, n.1, p. 59 – 64, 1981.

HAZEN, J. L. Adjuvants-terminology, classification, and chemistry. **Weed Technology**, v. 14, n. 4, p. 773-784, 2000.

JAASTAD, G.; RØEN, D.; NORNES, L. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* against lepidopterans in Norwegian apple orchards. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 100, p. 347–353, 2001.

KNAAK, N.; FIUZA, M. L. Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 36, p. 26-31, 2006.

MYERS, C.T.; HULL, L.A.; KRAWCZYK, G. Seasonal and cultivar associated variation in the oviposition preference of oriental fruit moth, (Lepidoptera: Tortricidae) adults and feeding behavior of neonate larvae in apples. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 99, n. 2, p. 349-358, 2006.

MONTEIRO, L. B.; SOUZA, A. Controle de Tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* em Fraiburgo – SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 423-428, 2010.

MORANDI FILHO W.J.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; ZANARDI, O.Z. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e inseticidas químicos no controle de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) em Videira. **Arquivos Instituto Biologia**, Campinas, v. 74, p. 129-134, 2007.

NETO e SILVA, O. A. B.; BOTTON, M.; GARCIA, M. S.; SILVA, A. da. Efeito de inseticidas reguladores de crescimento sobre ovos, lagartas e adultos de *Grapholita molesta* (BUSCK) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 420-428, 2011.

REISSIG, W. H.; WEIRES, R. W.; FORSHEY, W.; G. C.; ROCLOFS, W. L.; LAMB, R. C.; ALDWINCKLE, H. S. Insect management in disease-resistant dwarf and semi-dwarf apples trees. **Environmental Entomology**, v. 13, p. 1201- 1207, 1984.

SCHERRER-MONTERO, C. R.; ANTES, R. B.; SANTOS, R. P. dos.; SCHWARZ, L. L.; SANTOS, L. C. dos.; ANDREAZZA, C. S.; BENDER, R. J. Efeitos da escovação em máquina classificadora na cutícula de maçãs cultivares Fuji e Gala. **Biotemas**, v. 22, n. 2, p. 9-17, 2009.

SIMPSON, C. B. The codling moth. U.S. Dept. Agric., **Division of Entomology**, v. 41, 105 p., 1903.

SIQUEIRA, P. R. E.; GRÜTZMACHER, A. D. Avaliação de inseticidas para controle da *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de pessegueiro sob produção integrada na região da Campanha do RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 185-191, 2005.

SOUZA, B.; SANTA-CECÍLIA, C. V. L.; SOUSA, V. O. L. Ocorrência e Danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em Pessegueiros no Município de Caldas, MG. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p. 185-188, 2000.

**CAPITULO III. ANÁLISE DO EFEITO RESIDUAL DE FORMULAÇÕES
COMERCIAIS DE *Bacillus thuringiensis* EM MAÇÃ NA MORTALIDADE DE LARVAS
DE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EM
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO**

RESUMO – O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito residual de produtos comerciais de *B. thuringiensis* (*Bt*) em maçã sobre duas populações de *G. molesta* em laboratório e casa de vegetação. Os bioinseticidas avaliados em laboratório foram Dipel[®], Xentari[®], Agree[®] (dose 100g i.a. 100L⁻¹) e água destilada foi utilizada como tratamento testemunha. Maçãs “Eva” foram imersas nas soluções dos tratamentos propostos. Os frutos receberam larvas de *G. molesta* (1^o ínstar) de populações provenientes de Porto Amazonas-PR e Lages-SC em diferentes períodos (2, 48, 96 e 144 h) após os tratamentos. A mortalidade e a preferência de penetração de larvas nas maçãs foram avaliadas aos sete dias. Em casa de vegetação maçãs foram imersas em solução de Dipel[®] (dose 100g i.a. 100L⁻¹) e empregou-se água destilada como controle. Cada fruto recebeu duas larvas de *G. molesta* de população originária de Lages (1^o ínstar) em diferentes períodos (2, 48, 96 e 144 h) após a imersão. A mortalidade foi verificada aos 15 dias. A persistência de *Bt kurstaki* foi avaliada através de contagem de células viáveis, feitas a partir de isolamentos em quatro períodos (2, 48, 96 e 144 h), após a imersão de maçãs em solução de Dipel[®]. As contagens de UFC/fruto foram realizadas 24 h após a incubação das amostras. Os resultados obtidos em laboratório não mostraram diferenças entre os períodos de infestação na mortalidade de *G. molesta*. A população originária de Lages demonstrou ser mais suscetível do que Porto Amazonas, com média de mortalidade de 31% e 17%, respectivamente. A maioria das larvas penetrou através do cálice (71%). Em casa de vegetação os períodos de infestação não diferiram entre si na mortalidade das larvas. O isolamento de *Bt kurstaki* feito 2 h após a imersão teve maior quantidade de UFC/fruto (5,12 log₁₀/fruto), entretanto observou-se manutenção de células viáveis da bactéria até 144 h após a aplicação de Dipel[®].

Termos para Indexação: Dipel[®], Xentari[®], Agree[®], controle biológico

**ANALYSIS OF THE RESIDUAL EFFECT ANALYSIS OF THE RESIDUAL
EFFECT OF COMMERCIAL FORMULATIONS IN APPLE *Bacillus thuringiensis*
MORTALITY IN LARVAE OF *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916)
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) UNDER LABORATORY AND
GREENHOUSE**

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the residual effect of formulations of *B. thuringiensis* (*Bt*) in apple against two *G. molesta* populations in laboratory and greenhouse. The insecticides evaluated in laboratory were Dipel[®], Xentari[®], Agree[®] (100g dose a.i. 100L⁻¹) and distilled water was used as a control. “Eva” cv apples were immersed in solutions of biopesticides. The fruits were infested with *G. molesta* larvae (first instar) from Port Amazonas-PR and Lages-SC populations in different periods (2, 48, 96 and 144 hours) after treatments. The mortality and priority penetration site of larvae in apples were assessed at seven days. In greenhouse apples were immersed in Dipel[®] solution (100 g a.i. dose 100L⁻¹) and distilled water was used as a control. Each fruit received two *G. molesta* larvae from Lages population (first instar) in different periods (2, 48, 96 and 144 h) after immersion. Mortality was observed at 15 days. The persistence of *Bt kurstaki* was evaluated by viable cell account from the isolations at 2, 48, 96 and 144 h after the immersion of the apples. The CFU counts were after 24 h incubation period. For the infestation periods, the laboratory results showed no difference in mortality of *G. molesta*. The insect population from Lages was more susceptible to *Bt* than Port Amazon one, with an average mortality of 31% and 17%, respectively. Most larvae penetrated through the cup (71%). In greenhouse the infestation periods also showed no difference in the mortality of larvae. After 2 h from fruit immersion, the isolation of *Bt kurstaki* had larger numbers of CFU (5.12 Log₁₀/ per fruit), however it was observed the maintenance of viable cells up to 144 h after the application of Dipel[®].

Index terms: Dipel[®], Xentari[®], Agree[®], biological control.

3.1 INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é um importante agente de controle de insetos-praga, principalmente lepidópteros. Segundo Charnley (1991), as principais subespécies de *Bt* utilizadas na produção de bioinseticida são *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, aplicados no controle de lepidópteros na agricultura e na produção florestal, *B. thuringiensis* var. *aizawai*, causando toxicidade em lepidópteros e dípteros e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, utilizados no controle de dípteros.

Este entomopatógeno atua na fase larval, através da ingestão de esporos e cristais de proteínas Cry pulverizados sobre a planta. Esses cristais proteicos, produzidos durante o processo de esporulação, possuem atividade inseticida (KNAAK e FIUZA, 2006). Os cristais de toxinas, ao serem ativados por meio de ação de enzimas digestivas e pH alcalino, interferem na homeostase do inseto, promovendo a ruptura da parede celular do mesêntero e alterando o balanço osmótico (GILL, 1995).

Os produtos a base de *Bt* representam mais de 90% do mercado de biopesticidas na América do Norte (POLANCZYK e ALVES, 2003). Estes bioinseticidas são considerados importantes ferramentas utilizadas como alternativa aos inseticidas químicos no controle de diversos insetos-praga. No entanto, a reduzida persistência das formulações comerciais pode ser considerada uma das principais causas da eficiência insatisfatória para determinados grupos de insetos (PINNOCK *et al.*, 1971). As formulações apresentam estabilidade limitada no campo, devido ao efeito de temperatura, orvalho, precipitação pluviométrica (MCGUIRE e SHASHA, 1990; FIUZA e BERLITZ, 2009) e radiação ultravioleta (POLANCZYK e ALVES, 2003).

Alguns autores realizaram estudos sobre a persistência de esporos viáveis de *Bt* diretamente sobre superfícies foliares (CANTWELL e FRANKLIN, 1966; PINNOCK *et al.*, 1971; PINNOCK *et al.*, 1975; HADDAD *et al.*, 2005) em laboratório, casa de vegetação e campo. No entanto, os autores não avaliaram a persistência de *Bt* na mortalidade da praga-alvo sobre frutos. Estes estudos podem fornecer indícios importantes para determinar o potencial de toxicidade do entomopatógeno sobre a mortalidade do inseto-praga.

Grapholita molesta (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) é uma praga primária em fruticultura, caracterizada por penetrar em frutos sem se alimentar da epiderme (GARCIA e TOUZA, 1969), mas se alimentando do carpo (SOUZA *et al.*, 2000), onde fica protegida da ação de qualquer produto fitossanitário, principalmente os

que atuam por ingestão. Este comportamento alimentar permite que a larva permaneça na superfície do fruto por pouco tempo antes da penetração (MYERS *et al.*, 2006) podendo influenciar na eficiência de inseticidas que atuam por ingestão, como é o caso do *Bt*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a persistência toxicológica de produtos comerciais de *B. thuringiensis* em maçã sobre duas populações de *G. molesta*, no laboratório e casa de vegetação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios para verificar a persistência de toxicidade de *Bt* em maçã infestadas com larvas de *G. molesta* foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LAMIP) e casa de vegetação (80 m²) da Universidade Federal do Paraná. A avaliação da persistência de *Bt* em maçã foi feito no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR.

3.2.1 Criação de *Grapholita molesta*

Ovos de *G. molesta* foram obtidos a partir de populações mantidas em salas de criação no LAMIP em ambiente climatizado com temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase 16 h. As populações foram coletadas em Lages-SC e Porto Amazonas-PR. Larvas foram multiplicadas em dieta artificial à base de milho de acordo com metodologia de Guennelon *et al.* (1981). Os adultos foram colocados em garrafas de polietileno transparentes para acasalamento e alimentados com dieta líquida à base de açúcar a 25%. Foram utilizadas nos bioensaios larvas neonatas de até três horas de vida.

3.2.2 Efeito residual de *Bt* em laboratório

A avaliação do efeito residual de *Bt* foi realizada com os bioinseticidas Dipel® WG (*B. thuringiensis kurstaki* - *Btk*, linhagem HD-I, 540 g i.a/ kg) (Abbott Laboratories), Xentari® WG (*B. thuringiensis aizawai* – *Bta*, 540 g i.a/ kg) (Abbott Laboratories) e Agree® WP (*B. thuringiensis aizawai*, linhagem GC-91 transconjugado com toxinas de *Btk*, 500 g i.a/ Kg) (Certis USA, LLC) na concentração 100g i.a. 100 L⁻¹ e testemunha (água destilada). Maçãs ‘Eva’ maduras foram imersas em soluções contendo os tratamentos. Após 2 h de secagem, em temperatura ambiente, as maçãs foram transferidas

para recipientes de polietileno (300 mL) dispostos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 (tratamentos) x 2 (populações) x 4 (período de infestação) com 15 repetições para a população de Porto Amazonas-PR e 12 repetições para a população de Lages-SC. Cada repetição consistiu de dois frutos. As infestações foram realizadas em quatro períodos após a imersão dos frutos (2, 48, 96, 144 h), onde cada fruto recebeu uma larva de *G. molesta* de cada população, depositada na região da superfície mediana da maçã. Os recipientes foram fechados com plástico transparente e acondicionados em sala climatizada (22 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 16 h). A mortalidade das larvas foi avaliada aos sete dias após a infestação e determinada pelos indivíduos que não responderam ao toque do pincel. Uma vez identificado o orifício de penetração, as maçãs foram fatiadas em espessura de 0,5 cm até que se encontrasse a larva. Esse procedimento foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópico. A preferência de penetração das larvas nas maçãs foi quantificada de acordo com três locais distintos da maçã: cálice, pedúnculo e superfície mediana.

3.2.3 Efeito residual de *Bt* em casa de vegetação

Foi avaliado o efeito residual de Dipel® em maçãs infestadas com larvas neonatas de *G. molesta* em diferentes períodos após o tratamento. Frutos foram afixados em ramos de macieira, cultivadas em vasos de polietileno (40 L) com barbante de algodão (30 cm comprimento), por não haver disponibilidade de frutos na planta. Os vasos foram dispostos em espaçamento de 0,90 m entre plantas e 1,10 m entre linhas. Frutos, maduros, foram imersos por 20 segundos em solução contendo Dipel® e em água destilada (testemunha). Após 1 h de secagem em temperatura ambiente, cada fruto recebeu duas larvas de *G. molesta*, originária de Lages-SC, as quais foram depositadas sobre a superfície mediana dos frutos em quatro diferentes períodos (2, 48, 96, 144 e 196 h) após o tratamento. No 15º dia, os frutos foram retirados das plantas e levados ao laboratório para as avaliações de mortalidade, de acordo com a metodologia descrita item 3.2.2. A temperatura média da casa de vegetação durante o período da condução do experimento foi de 26°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (tratamentos) x 4 (períodos de infestação), constituído de 12 repetições de dois frutos.

3.2.4 Efeito residual de *Bt kurstaki* através de contagem de células viáveis

O efeito residual de células viáveis de *Bt kurstaki* (Dipel®) em maçã foi verificado por meio de isolamentos de frutos realizados em diferentes períodos após a sua imersão. Maças maduras foram imersas em solução de Dipel® por 20 segundos e deixados para secar por 2 h. Os processos de recuperação e isolamento de *Bt kurstaki* foram realizados 2, 48, 96, e 144 h após o tratamento das maçãs. As maçãs foram colocadas individualmente em sacos plásticos contendo 50 mL de solução tampão fosfato, submetidos à agitação (150 rpm) por 2 h à 27 °C. Em seguida, o conteúdo líquido foi transferido para tubos Falcon (50 mL) e centrifugados (5000 rpm) por 10 min à 20 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se ao pellet 5 mL de água autoclavada. Os tubos foram ressuspensos em vortex e deixados em banho-maria por 20 min a 80 °C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada amostra para a realização da diluição em série (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB), receberam 100 µL de cada diluição. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 repetições, cada uma representada por um fruto. As amostras permaneceram incubadas a 30°C durante 24 h. A avaliação foi realizada após o período de incubação através de contagens de colônias bacterianas, ajustadas para unidades formadoras de colônias (UFC) por fruto.

3.2.5 Análise Estatística

Os dados que não apresentaram normalidade através do teste de Shapiro- Wilk foram transformados em \sqrt{x} . Utilizou-se análise de variância pelo teste F ao nível de ($P \leq 0,05$) e comparação de médias pelo teste de Fisher – LSD (Least Significant Difference), através do software STATGRAPHICS Centurion XVI. A mortalidade corrigida foi determinada fórmula de Abbott (1925).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito residual de *Bt* em laboratório

De um modo geral, não houve diferença estatística entre os períodos de infestação para nenhum dos tratamentos. No entanto, o efeito residual de *Bt* foi mantido causando mortalidade em larvas de *G. molesta* até 144 h após a imersão dos frutos. A infestação realizada 2 h após a imersão dos frutos com larvas provenientes da população de Porto Amazonas apresentou diferença significativa das formulações comerciais de *Bt* em relação à testemunha ($F= 2,79$; $df= 3$; $P= 0,0486$) (Tabela 3.1). A população de Lages-SC apresentou diferença significativa entre os tratamentos nos períodos de infestação de 2 h ($F= 5,55$; $df= 3$; $P= 0,0026$), 48 h ($F= 3,34$; $df= 3$; $P= 0,0276$) e 96 h ($F= 4,77$; $df= 3$; $P= 0,0058$) (Tabela 3.1) após a imersão dos frutos. Xentari® foi superior a Dipel® e a testemunha na infestação de 2 h, com média de mortalidade de 45%. Nas infestações realizadas 48 e 96 h após a imersão dos frutos as formulações comerciais de *Bt* não diferiram entre si, porém Dipel® e Xentari® ocasionaram maior mortalidade quando comparados com a testemunha. Comparando-se a mortalidade entre as populações de *G. molesta* verificou-se diferença significativa ($F= 13,80$; $df= 1$; $P= 0,0002$) (Tabela 3.1), onde a população de Lages-SC demonstrou ser mais suscetível (31%) que a população de Porto Amazonas (17%).

Analisando a preferência de penetração de larvas de *G. molesta*, verificou-se que o local de penetração foi no cálice com um percentual médio em todos os tratamentos: Dipel® ($F= 257,31$; $df= 2$; $P= 0,0000$), Xentari® ($F= 114,73$; $df= 2$; $P= 0,0000$), Agree® ($F= 470,29$; $df= 2$; $P= 0,0000$) e testemunha ($F= 169,75$; $df= 2$; $P= 0,0000$) (Tabela 3.2). Este resultado foi comprovado por Myers et al. (2006) quando analisaram preferência de penetração em diferentes cultivares de maçãs. Esta preferência de penetração pode justificar a baixa mortalidade, pois a estrutura do cálice mantém as larvas protegidas da ação de produtos fitossanitários.

Apesar das formulações comerciais de *Bt* terem apresentado efeito residual durante todo o período de estudo, a porcentagem de controle foi inferior a 45%, sendo insatisfatória para *G. molesta*. Este resultado sugere que a baixa eficiência esteja relacionada com o comportamento alimentar da larva, uma vez que ela permanece pouco tempo sobre a superfície do fruto (MYERS et al., 2006) por se tratar de uma larva

broqueadora. Estudos realizados com Dipel® sobre *Argyrotaenia sphaleropa* (Lepidoptera: Tortricidae) resultou em 91% de mortalidade 72 h após a imersão de discos foliares de videira (MORANDI FILHO *et al.*, 2007). Porém, o sucesso no controle está relacionado ao fato da larva possuir um comportamento alimentar desfolhador. Batista Filho *et al.* (1998) afirmaram que a persistência de *Bt* é um fator importante para o sucesso de uma formulação, uma vez que alguns lepidópteros apresentam comportamento alimentar que pode reduzir a sua exposição ao produto, como é o caso de *G. molesta*. Porém, neste trabalho constatou-se que para *G. molesta* um maior efeito residual não resultou em maior eficiência.

3.3.2 Efeito residual de *Bt* em casa de vegetação

O bioinseticida Dipel®, quando aplicado em maçãs em casa de vegetação, não apresentou diferença estatística na mortalidade de larvas de *G. molesta*, nos diferentes períodos de infestação, corroborando os resultados obtidos do experimento realizado em laboratório. Dipel® proporcionou mortalidade significativa em relação à testemunha nas infestações realizada 2 h ($F= 7,59$; $df= 1$; $P= 0,0115$) e 48 h ($F= 4,66$; $df= 1$; $P= 0,0420$) (Tabela 3.3) após o tratamento dos frutos. O efeito residual de *Bt* foi mantido ao longo dos períodos de infestação, no entanto a porcentagem de controle de *G. molesta* ficou em torno de 33%. A persistência de *Bt* pode variar de acordo com as condições ambientais, devido a fatores abióticos (POLANCZYK e ALVES, 2003). Haddad *et al.*, (2005) observaram, em condições de campo, uma queda na quantidade de esporos viáveis de *Bt* 27 h após a pulverização da superfície foliar de plantas de milho. Embora, na casa de vegetação, haja a influência da radiação ultravioleta na degradação de *Bt*, a baixa mortalidade de *G. molesta* provavelmente esteja novamente relacionada com o comportamento alimentar deste tortricídeo, pois no experimento em laboratório o resultado também foi insatisfatório.

3.3.3 Efeito residual de *Bt kurstaki* através de contagem de células viáveis

A quantidade de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas por fruto foi significativamente diferente entre os períodos de inoculação de *Bt* ($F= 5,16$; $df= 3$; $P= 0,0068$) (Figura 3.1). A inoculação realizada 2 h após a imersão das maçãs em solução de Dipel®, foi superior aos demais períodos de inoculação,

apresentando 5,12 log₁₀ UFC/fruto. Os demais períodos foram semelhantes entre si, onde a inoculação realizada 48 h após a imersão foi de 4,65 log₁₀ UFC/fruto, 96 h foi de 4,81 log₁₀ UFC/fruto e 144 h foi de 4,71 log₁₀ UFC/fruto.

Neste experimento observou-se que a população de *Bt kurstaki* se manteve até 144 h após a imersão dos frutos. Na testemunha, onde os frutos foram imersos em água destilada, não se detectou a presença de *Bt kurstaki* nas amostras. Cabe ressaltar que este experimento foi realizado com o intuito de investigar a baixa eficiência de *Bt* no controle de *G. molesta* em laboratório e casa de vegetação. Além do hábito broqueador de *G. molesta* outro fator que poderia contribuir para a pouca eficiência das formulações de *Bt* era a baixa persistência de células viáveis da bactéria no fruto. No entanto, foi constatada a presença de grande quantidade de células viáveis da bactéria na superfície da maçã durante todo o período de realização das infestações dos frutos, após a imersão.

Alguns pesquisadores já verificaram a persistência de *Bt kurstaki* por períodos mais prolongados. Entretanto, não há informações a respeito da toxicidade para determinadas pragas-alvo. Reardon e Haissig (1984) verificaram a persistência de *Bt kurstaki* até um ano após a pulverização sobre Abeto, plantas da família Pinaceae suscetíveis à *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Limantriidae). Em trabalhos realizados por Pedersen et al. (1995), foi detectada a presença de *Bt kurstaki* em áreas de plantio de couve, sete meses após a pulverização.

A presença de células viáveis de *Bt kurstaki* por até 144 h confirma a hipótese de que o controle insatisfatório de *G. molesta* está relacionado com o comportamento alimentar da larva e com a estrutura da maçã. Em estudos realizados por Andermatt et al. (1988), foi verificado que larvas de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) não se alimentam durante a penetração na maçã. Estas larvas, assim como *G. molesta*, também possuem o hábito de perfurar os frutos e se alimentar do seu interior. Além de o comportamento alimentar, a preferência de penetração pelo cálice da maçã também colabora para que a chance de contaminação de *Bt* diminua.

Tabela 3.1 – Percentagem média de mortalidade (\pm EP) de duas populações de larvas de *G. molesta* infestada, em diferentes períodos, em maçãs imersas em três formulações comerciais de *B. thuringiensis*, em laboratório.

		Infestação dos frutos após a imersão (h)			
		População Porto Amazonas - PR			
Tratamentos	N ¹	2 h	48 h	96 h	144 h
		Mortalidade (%)			
Agree® WP	108	26,67 \pm 9,59 a A	10,00 \pm 5,35 a A	16,67 \pm 7,97 a A	13,33 \pm 5,91 a A
Dipel® WG	104	20,00 \pm 8,16 a A	33,33 \pm 11,62 a A	23,33 \pm 9,59 a A	16,67 \pm 6,30 a A
Xentari® WG	109	33,33 \pm 9,34 a A	26,67 \pm 9,59 a A	20,00 \pm 8,16 a A	10,0 \pm 7,24 a A
Testemunha	118	3,33 \pm 3,33 a B	6,67 \pm 4,54 a A	3,33 \pm 3,33 a A	3,33 \pm 3,33 a A
		Mortalidade corrigida (%)			
Agree® WP		21,29	4,34	11,77	11,33
Dipel® WG		19,44	28,57	20,33	15,71
Xentari® WG		28,30	19,64	15,61	7,64
		População Lages - SC			
Tratamentos	N ¹	2 h	48 h	96 h	144 h
		Mortalidade (%)			
Agree® WP	87	41,67 \pm 10,36 a AB	25,00 \pm 9,73 a AB	25,00 \pm 8,91 a AB	37,50 \pm 8,97 a A
Dipel® WG	90	25,00 \pm 9,73 a BC	37,50 \pm 8,97 a A	33,33 \pm 9,40 a A	33,33 \pm 9,40 a A
Xentari® WG	90	50,00 \pm 8,70 a A	33,33 \pm 11,24 a A	45,83 \pm 9,65 a A	37,50 \pm 10,88 a A
Testemunha	93	4,17 \pm 4,17 a C	4,17 \pm 4,17 a B	4,17 \pm 4,17 a B	8,33 \pm 5,62 a A
		Mortalidade corrigida (%)			
Agree® WP		36,36	20,50	22,73	34,29
Dipel® WG		22,73	40,37	31,82	23,81
Xentari® WG		45,45	31,95	38,22	30,30

¹ N = número de larvas observadas; ² As médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$); Mortalidade Corrigida: Abbott (1925)

Tabela 3.2 - Percentagem média (\pm EP) de larvas de *G. molesta* que penetraram em três locais distintos da maçã (cálice, pedúnculo e superfície mediana) em frutos tratados com as formulações comerciais à base de *B. thuringiensis* em laboratório.

		Locais da maçã (%)		
Tratamentos	N ¹	Cálice	Pedúnculo	Superfície mediana
Agree® WP	216	81,48 \pm 2,08 a A	3,41 \pm 1,34 c A	14,81 \pm 2,28 b A
Dipel® WG	216	70,83 \pm 2,82 a A	0,00 \pm 0,00 c B	25,92 \pm 2,65 b A
Xentari® WG	216	73,15 \pm 4,22 a A	5,09 \pm 1,63 c A	20,83 \pm 3,56 b A
Testemunha	216	74,53 \pm 3,31 a A	1,85 \pm 0,86 c AB	24,07 \pm 3,58 b A

¹ N = número de frutos observados; ² As médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$);

Tabela 3.3 - Percentagem média de mortalidade (\pm EP) e mortalidade corrigida de larvas de *G. molesta* infestada, em diferentes períodos, sobre frutos imersos em Dipel[®], em casa de vegetação.

Período de infestação após a imersão dos frutos	N ¹	Tratamentos		
		Dipel [®] WG		Testemunha
		Mortalidade (%)	MC ³ (%)	Mortalidade (%)
2 h	24	41,67 \pm 8,33 a A	33,33	12,50 \pm 6,53 b A
48 h	24	33,33 \pm 7,11 a A	23,81	12,50 \pm 6,53 b A
96 h	24	20,83 \pm 7,43 a A	17,39	4,16 \pm 4,16 a A
144 h	24	16,67 \pm 7,10 a A	9,09	8,33 \pm 5,66 a A

¹ N = número de larvas observadas; ² As médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ($P \leq 0,05$); ³ MC (%) = percentagem de mortalidade corrigida (Abbott, 1925)

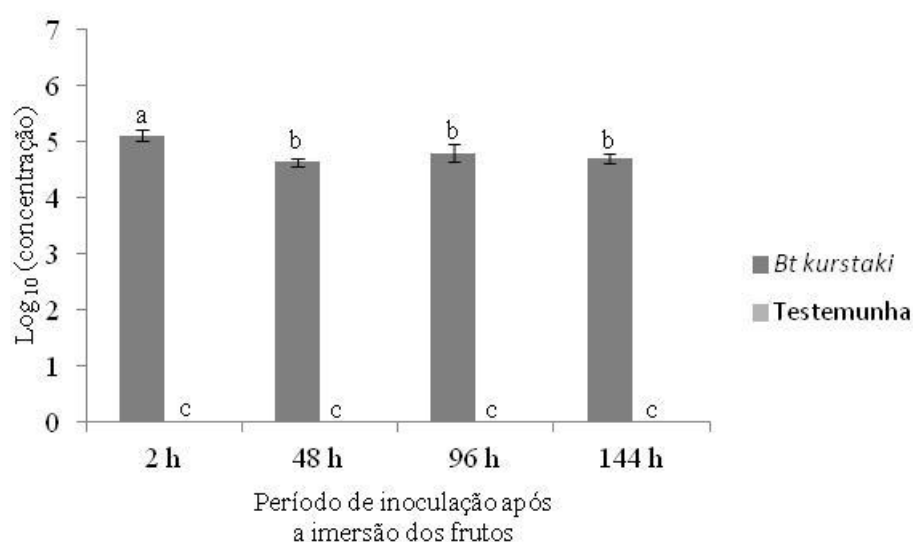


FIGURA 3.1 - Efeito residual de células viáveis de *Bt kurstaki* (Dipel[®] WG) (média de $\log_{10} \pm$ EP) em maçãs tratadas com Dipel[®], isoladas em quatro diferentes períodos após a aplicação. Dados analisados através de Anova e comparação de médias pelo teste LSD ($P \leq 0,05$).

3.4 CONCLUSÕES

- As formulações comerciais Dipel® WG, Xentari® WG e Agree® WP atuaram na mortalidade de indivíduos de *G. molesta* oriundos de Porto Amazonas – PR por até 2 h, em laboratório.
- A formulação comercial Xentari® WG atuou na mortalidade de indivíduos de *G. molesta* oriundos de Lages – SC por até 96 h, em laboratório.
- As larvas de *G. molesta* penetraram, preferencialmente, pelo cálice, independentemente do tipo de formulação de *Bt* aplicado sobre as maçãs, em laboratório.
- Dipel® WG causou mortalidade de larvas de *G. molesta* por até 48 h em casa de vegetação.
- O efeito residual de células viáveis, de *Bt kurstaki* (Dipel® WG) foi maior 2 h após a aplicação em maçã, em comparação a 48, 96, e 144 h.

3.5 REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.
- ANDERMATT, M., MANI, E., WILDBOLZ, T., LÜTHY, P. Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 49, p. 291–295, 1988.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A.; PEREIRA, R. M.; AUGUSTO, N. T. **Formulação de entomopatógenos**. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, cap. 25, p. 917-966, 1998.
- CANTWELL, G. E.; FRANKLIN B. A. Inactivation by irradiation of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, n. 3, p. 256-258, 1966.
- CHARNLEY, K. A. A Review Microbial pathogens and insect pest control. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.12, p. 149-157, 1991.
- GARCIA, M. F.; TOUZA, E. E. **Bioecología de *Grapholita molesta* Busck y sistema de alarma**. Buenos Aires: INTA, 1969. 8p.

GILL, S. S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p.69-74, 1995.

GUENNELON, G.; AUDEMARD, H.; FREMOND, J.C.; ABDELMAJID, E.M.; AMMARI, I. Progrès réalisés dans l' élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. **Agronomie**, v. 1, n.1, p. 59 – 64, 1981.

FIUZA, M.L.; BERLITZ, D.L. Produtos de *Bacillus thuringiensis*: registro e comercialização. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 38, p. 58 – 60, 2009.

HADDAD, M. L.; POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B.; GARCIA, M. O. Field persistence of *Bacillus thuringiensis* on maize leaves (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n.4, p. 309-314, 2005.

KNAAK, N.; FIUZA, M. L. Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 36, p. 26-31, 2006.

MCGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 1813-1817, 1990.

MORANDI FILHO W.J.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; ZANARDI, O.Z. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e inseticidas químicos no controle de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) em Videira. **Arquivos Instituto Biologia**, Campinas, v. 74, p. 129-134, 2007.

MYERS, C.T.; HULL, L.A.; KRAWCZYK, G. Seasonal and cultivar associated variation in the oviposition preference of oriental fruit moth, (Lepidoptera: Tortricidae) adults and feeding behavior of neonate larvae in apples. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 99, n. 2, p. 349-358, 2006.

PEDERSEN, J. C.; DAMGAARD, P. H.; EILENBERG, J.; HANSEN, B. M. Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in an experimental cabbage field. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p.118–125, 1995.

PINNOCK, D. E.; BRAND, R. J.; MILSTEAD, J. E. Effect of three species on the coverage and field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 25, n.3, p. 209-214, 1975.

PINNOCK, D. E.; BRAND, R. J.; MILSTEAD, J. E. The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 18, n. 4, p. 405-411, 1971.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montevideo, v. 7, p. 1-10, 2003.

REARDON, R. C.; HAISSIG, K. Efficacy and field persistence of *Bacillus thuringiensis* after ground application to balsam fir and white spruce in Wisconsin. **Canadian Entomology**, v. 116, p. 153–158, 1984.

SOUZA, B.; SANTA-CECÍLIA, C. V. L.; SOUSA, V. O. L. Ocorrência e Danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em Pessegueiros no Município de Caldas, MG. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p.185-188, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

As formulações comerciais Dipel[®], Xentari[®] e Agree[®] aplicadas na concentração de 100 g/ 100 L⁻¹ de calda, em maçã ‘Eva’, através dos métodos de pulverização e imersão, não apresentaram eficiência satisfatória na mortalidade de *Grapholita molesta* nos testes de laboratório, casa de vegetação e pomar.

REFERÊNCIAS

ALVES, B. T. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Fealq, 1998. 1163p.

ANDERMATT, M., MANI, E., WILDBOLZ, T., LÜTHY, P. Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 49, p. 291–295, 1988.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícola**. 8. ed. São Paulo: Edição do autor, 2009. 1380 p.

ARIOLI, C.J.; BOTTON, M.; CARVALHO, G. A. Controle químico de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura do pessegueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p.1695-1700, 2004.

CARDÉ, R.T.; MINKS, A.K. Control of moth pests by mating disruption: Successes and constraints. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 559-585, 1995.

CHARNLEY, K. A. A Review Microbial pathogens and insect pest control. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.12, p. 149-157, 1991.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; Van RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the literature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 807- 813, 1998.

GILL, S. S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p.69-74, 1995.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000. 350 p.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant disease 1970- 1980**. London: Academic Press, 1981. p. 1837- 1896.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. **Virulence of *Bacillus thuringiensis***. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 41-64, 2000.

HARVEY, W. R., CIOFFI, M., WOLFERSBERGER, M. G. Chemiosmotic potassium ion pump of insect epithelia. **The American Journal of physiology**, Baltimore, v. 244, p. 163-75, 1983.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, p.242-255, 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática**. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=t&o=11&i=P>>. Acesso em: 11 dez. 2011.

KNAAK, N.; FIUZA, M. L. Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 36, p. 26-31, 2006.

LI, J.; CARREL, J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxina from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v. 353. n. 7, p. 815-821, 1991.

MCGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 1813-1817, 1990.

MONNERAT, R.G; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 163-192, 2000.

MONTEIRO, L.B.; HICKEL, E. **Pragas de importância econômica em fruteiras de caroço**. In: MONTEIRO, L.B.; MAY DE MIO, L.L.; MONTE SERRAT, B.; MOTTA, A.C.V.; CUQUEL, F.L. (Org.). *Fruteiras de caroço: Uma visão ecológica*. Curitiba, 2004. p. 223-262

MONTEIRO, L. B.; SOUZA, A. Controle de Tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* em Fraiburgo – SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 423-428, 2010.

MORANDI FILHO W.J.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; ZANARDI, O.Z. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e inseticidas químicos no controle de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) em Videira. **Arquivos Instituto Biologia**, Campinas, v. 74, p. 129-134, 2007.

MYERS, C.T.; HULL, L.A.; KRAWCZYK, G. Seasonal and cultivar associated variation in the oviposition preference of oriental fruit moth, (Lepidoptera: Tortricidae) adults and feeding behavior of neonate larvae in apples. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 99, n. 2, p. 349-358, 2006.

NUNES, J.L. da S.; MARODIN, G.A.B. Inseticidas metoxifenozone e etofenproxi para o controle de mariposa-oriental *Grapholita molesta* Busck, 1916) em produção integrada de pêssogo. **Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 316, p. 511-516, 2007.

PEFEROEN, M. **Insect control with transgenic plants expressing *Bt* crystal proteins**. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M., ed. *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. London: Taylor & Francis, p. 21-48, 1997.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B. Introdução: Macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 841-843, 2008.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia**, Montevideo, v. 7, p. 1-10, 2003.

PROTAS, J. F. S.; SANHUEZA, R. M. V. **Normas Técnicas e Documentos de Acompanhamento da Produção Integrada de Maçãs**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2002. 64 p. (Documentos, 33).

REZENDE, M.A.A.; CRUZ, I.; DELLA LUCIA, T.M.C. Consumo foliar de milho e desenvolvimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) parasitadas por *Chelonus insularis* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n. 3, p. 473-478, 1994.

ROHR, R. J.; CRUMRINE, P. W. Effects of an herbicide and insecticide on pond community structure and processes. **Ecological Applications**, v. 15, n. 4, p. 1135-1147, 2005.

SALLES, L. A. B. **Grafolita (*Grapholita molesta*) bioecologia e controle**. Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1984. 16 p. (Documentos, 20).

SALLES, L. A. B. **Grafolita (*Grapholita molesta*): bioecologia e controle**. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT. 1991. 13p. (Documentos, 42).

SALLES, L. A. Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2000. 173p.

SIQUEIRA, P. R. E.; GRÜTZMACHER, A. D. Avaliação de inseticidas para controle da *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de pessegueiro sob produção integrada na região da Campanha do RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 185-191, 2005

SMIRLE, M. J.; LOWERY, D. T.; ZUROWSKI, C. L. Susceptibility of Leafrollers (Lepidoptera: Tortricidae) from Organic and Conventional Orchards to Azinphosmethyl, Spinosad, and *Bacillus thuringiensis*. **Journal Economic Entomology**, v. 96, n. 3, p. 879-884, 2003.

SOUZA, B.; SANTA-CECÍLIA, C. V. L.; SOUSA, V. O. L. Ocorrência e Danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em Pessegueiros no Município de Caldas, MG. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p.185-188, 2000.

TUNAZ, H.; UYGUN, N. Insect growth regulators for insect pest control. **The Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 28, p. 377- 387, 2004.

VILELA, E.F.; DELLA LÚCIA, T.M.C. **Introdução aos semioquímicos e terminologia**. In: VILELA, E.F.; DELLA LÚCIA, T.M.C. (eds.). Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas. Ribeirão Preto: Holos, p. 9-12, 2001.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. **Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests**. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 81-100, 2000.